

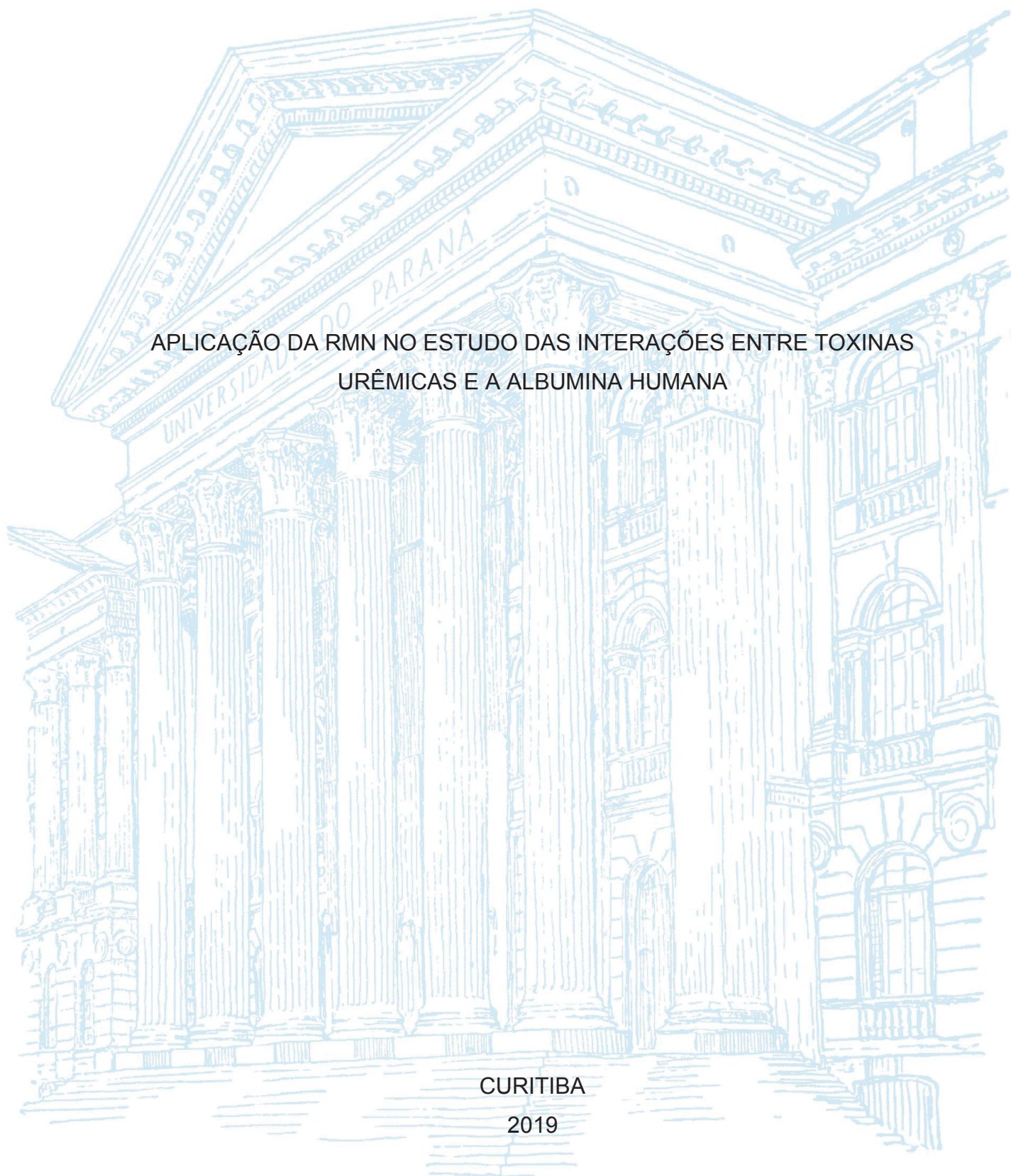
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEOCILEY ROCHA ALENCAR MENEZES

APLICAÇÃO DA RMN NO ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE TOXINAS
URÊMICAS E A ALBUMINA HUMANA

CURITIBA

2019



LEOCILEY ROCHA ALENCAR MENEZES

APLICAÇÃO DA RMN NO ESTUDO DAS INTERAÇÕES ENTRE TOXINAS
URÊMICAS E A ALBUMINA HUMANA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Andersson Barison

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

M543a Menezes, Leociley Rocha Alencar

Aplicação da RMN no estudo das interações entre toxinas urêmicas e a albumina humana
[recurso eletrônico] / Leociley Rocha Alencar Menezes. – Curitiba, 2019.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação
em Química, 2019.

Orientador: Andersson Barison.

Coorientador: Guilherme Lanzi Sassaki.

1. Ressonância magnética nuclear. 2. Proteínas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Barison,
Andersson. III. Sassaki, Guilherme Lanzi. IV. Título.

CDD: 538.362

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LEOCILEY ROCHA ALENCAR MENEZES** intitulada: **Aplicação da RMN no estudo das interações entre toxinas urêmicas e a albumina humana**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

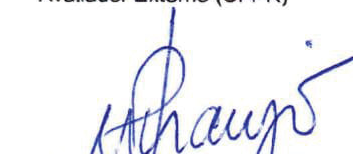
CURITIBA, 22 de Abril de 2019.


GUILHERME LANZI SASSAKI
Presidente da Banca Examinadora


CAROLINE DA ROS MONTES D'OCA
Avaliador Interno (UFPR)


RENAN BORSOI CAMPOS
Avaliador Externo (UFPR)


MARCOS ROGÉRIO MAFRA
Avaliador Externo (UFPR)


MÁRCIO PERES DE ARAUJO
Avaliador Interno (UFPR)

Dedicatória

A minha família, principalmente, aos meus pais Elmar da Cruz Menezes e Nivalda Rocha Alencar, ao meu irmão Luciano Menezes, a minha irmã Pollyanne Menezes e aos meus sobrinhos Arthur Santana e Caio Menezes pelo apoio incondicional durante todo o período de realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do Paraná, ao Departamento de Química e Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

A Fundação Araucária, ao CNPq e FINEP pelo financiamento dos espectrômetros de RMN e da infraestrutura utilizada nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Andersson Barison pelos ensinamentos, pela orientação e oportunidades científicas que contribuíram para o aprimoramento do meu aprendizado.

Ao Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa de braços abertos, pela orientação, ensinamentos diários, apoio, disponibilidade, profissionalismo e por todas as contribuições significativas que colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores doutores Marcelo Müller, Marcio Peres e Alfredo Marques por todas as valorosas contribuições para o desenvolvimento e aperfeiçoamento durante o exame de qualificação.

A Prof^a. Dr^a. Andréa Stinghen e sua aluna Giane Favareto pela disponibilidade para conversar que auxiliaram na elaboração do tema desse trabalho.

As técnicas Andrea e Patrícia pelo auxílio nas aquisições dos dados de ITC.

Agradeço a Dr^a. Elaine Kaspachak por toda ajuda, esclarecimentos e prontidão para a auxiliar no tratamento dos dados de ITC.

As Prof^{as}. Dr^a. Jaísa Fernandes Soares e Noemi Nagata, pela mediação do conhecimento, apoio e incentivo que contribuíram para o meu aprendizado profissional e pessoal.

Ao amigo Dr. Arquimedes Paixão pela amizade, companhia e ajuda ao longo dessa jornada.

Aos amigos da NCASA Luana, Poliana, Karine, Estela, Breno, e principalmente ao Alberto, Cesar e Luciano pela amizade, risadas, comidas, conversas e companheirismo.

Aos amigos da “Casa do Marão” Andressa, Kahoana, Patrícia, João Pedro de Albuquerque e obviamente a Mara Dalmolin por terem me acolhido em suas vidas, pelas aventuras que vivemos, conversas aleatórias numa sexta à noite ou em qualquer outro horário, muito obrigado.

Aos amigos do Laboratório E1 André Eduardo, Alexandre Kimura, Gabrielly, Aline, Renato, Iglesias e Adriana por todo o convívio, ensinamentos e parceria ao longo dos anos.

As amigas Magali Amorim, Tassya Matos, Luzia Lisboa e Yane Yonorato pela amizade e apoio em todos os momentos.

Aos amigos Charlene Anjos, Rafaelly Nascimento, Paloma Prata, Bruno Araújo, Hugo César, Adriano Aquino, Romário Santos, Camilo Bruno pela amizade, generosidade, conversas construtivas e diversos momentos de descontração.

Aos meus amigos do Laboratório de RMN: Maria de Fátima Santos, Alan Diego Santos, Lívia Dutra, Katlin Rech, Leice Novais e Sher Ali, Ana Caroline Marques pela amizade, apoio nos momentos de alegria e desafios, incentivo e ensinamentos que cada um ao seu modo me proporcionaram ao longo desses anos.

Aos amigos Fernanda Ocampos, Daniel Riter, Kahlile Kalil, Luis Paulo, Valmir da Silva pela amizade, apoio, conversas construtivas e diversos momentos de descontração.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação, em especial, Marcelino e Fernanda, pela disponibilidade me receber, ouvir e esclarecer minhas dúvidas.

Aos meus professores da Pós-graduação, Graduação, Ensino Médio, Ensino Fundamental pela contribuição em minha formação. A vocês o meu respeito e admiração!

Aos meus avós maternos Manoel e Plácida (*in memoriam*) e aos meus avós paternos Rita e Ernesto pelo apoio, palavras de sabedoria e exemplo de vida.

À família Martins, Gilma e Fabiana pela acolhida, por sempre estar de braços abertos para mim, ao meu amigo-irmão Uanderson pela amizade, conselhos, paciência e pelas conversas infundáveis. Por mais que escreva aqui, não conseguirei expressar o que está família significa para mim.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”
(ARTHUR SCHOPENHAUER, 2010, p. 156-157)

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) é uma síndrome caracterizada pela redução progressiva da capacidade de filtração glomerular do organismo. Esse processo causa o acúmulo de diversos compostos orgânicos que através de reações e interações com as proteínas presentes no organismo podem causar danos em vários tecidos e órgãos. O presente estudo teve como finalidade empregar a ressonância magnética nuclear (RMN) aliada a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) na avaliação das interações intermoleculares das toxinas urêmicas p-cresil sulfato (PCS) e indoxil sulfato (IS) com a proteína albumina sérica humana (HSA). Dessa forma, o experimento de RMN STD foi empregado para realizar o mapeamento dos epítomos dos ligantes e a determinação das constantes de dissociação de ambas as toxinas, bem como avaliar a influência da temperatura e da força iônica nessas interações. Além disso, foi realizado o ensaio de competição entre o PCS e o diazepam (inibidor do sítio II da HSA). O mapeamento dos epítomos através do experimento de RMN STD mostrou que os hidrogênios H-3/5 e H-5 do PCS e IS, respectivamente, são os que apresentam maior proximidade com o sítio de ligação da proteína. Através da determinação das constantes de dissociação (PCS: $K_d = 6,5$ mM e $4,8$ mM a 25 °C) foi observada uma afinidade moderada de ambas as toxinas com a HSA purificada revelando a maior afinidade da IS pela proteína. Também foi possível observar que a temperatura e a força iônica causam o aumento da interação do IS com a HSA purificada ($K_d = 2,4$ mM a 37 °C e $2,3$ mM a 25 °C), respectivamente. Enquanto para o PCS o aumento da temperatura resultou na diminuição da interação com HSA ($K_d = 8,5$ mM a 37 °C) e o aumento da força iônica não afetou essa interação ($K_d = 6,8$ mM a 25 °C). Esses resultados sugerem que a HSA purificada pode ainda conter resquício de acetiltriptofanato de sódio e caprilato de sódio e que esses compostos afetam de formas distintas a interação das toxinas urêmicas com a HSA. Na ausência desses compostos, observou-se um aumento da afinidade de ambas as toxinas (PCS: $K_d = 2,9$ mM e IS: $K_d = 3,1$ mM a 25 °C) com a HSA ($\geq 99\%$ de pureza), corroborando a hipótese de que a presença dos resquícios de acetiltriptofanato de sódio e caprilato de sódio interferem de modo que diminuem a afinidade do PCS e IS com HSA. O ensaio de competição indicou que o PCS tem afinidade pelo sítio II da HSA. Através dos experimentos de ITC foi possível a determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos dessas interações. Com relação aos dados termodinâmicos obtidos pelo ITC, foi observado que a ligação do PCS e IS com a HSA envolve interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Além disso, observou-se que a interação desses compostos com a proteína é governada principalmente pela contribuição entálpica o que sugere a presença de ligações de hidrogênio ou interações de Van der Waals entre essas moléculas e a proteína. Dessa forma, o experimento de RMN STD aliado a ITC permitem o entendimento das forças que regem as interações de PCS e IS com a HSA e esses resultados podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para aumentar a remoção desses compostos do organismo dos pacientes acometidos pela DRC.

Palavras-chave: RMN STD. ITC. Interações intermoleculares. Ligantes. Proteínas.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is a syndrome characterized by the progressive reduction of the body's glomerular filtration capacity. This process causes the accumulation of various organic compounds that, through reactions and interactions with proteins present in the body, can cause damage to various tissues and organs. This work intended to apply nuclear magnetic resonance (NMR) and isothermal titration calorimetry (ITC) to evaluate the intermolecular interactions of uremic toxins p-cresyl sulfate (PCS) and indoxyl sulfate (IS) with the protein human serum albumin (HSA). Therefore, the experiment of saturation-transfer difference (STD) NMR was adopted to perform epitopes mapping of ligands and determine dissociation constants of both toxins and the influence of temperature and ionic strength on these interactions. Besides, the competition assay between PCS and diazepam (site II inhibitor of HSA) was performed. Epitopes mapping using STD NMR experiment showed that hydrogens H-3/5 of PCS and H-5 of IS are the nearest to the protein binding site. A moderate affinity of both toxins with the purified HSA was revealed by determining dissociation constants (PCS: $K_d = 6,5$ mM and $4,8$ mM, 25 °C), suggesting a higher affinity of IS with the protein. Furthermore, it was possible to observe that the temperature and ionic strength cause increased interaction between IS and purified HSA ($K_d = 2,4$ mM at 37 °C and $2,3$ mM at 25 °C, respectively). For PCS, temperature increment resulted in decreased interaction with HSA ($K_d = 8,5$ mM at 37 °C), and the increase of ionic strength did not affect this interaction ($K_d = 6,8$ mM at 25 °C). These results suggest that purified HSA may present some vestiges of sodium acetyltryptophanate and sodium caprylate, and those compounds affect in distinct ways interactions of uremic toxins with HSA. In the absence of those compounds, it was observed an increase in affinity for both toxins (PCS: $K_d = 2,9$ mM and IS: $K_d = 3,1$ mM at 25 °C) with HSA ($\geq 99\%$ of purity), corroborating with the hypothesis of the affinity decrease of PCS and IS with HSA interfered by the presence of vestiges of sodium acetyltryptophanate and sodium caprylate. The competition test indicated the affinity of PCS with site II of HSA. ITC experiments enabled the determination of the kinetic and thermodynamic parameters of those interactions. In relation to the thermodynamic data obtained by the ITC, it was observed that linkage of PCS and IS with HSA involves electrostatic and hydrophobic interactions. Therefore, it was indicated that the interaction of these compounds with the protein is controlled mainly by the enthalpic contribution that suggests the presence of hydrogen bonds or Van der Waals interactions between these molecules and the protein. Lastly, STD NMR experiment combined with ITC allows the knowledge of strengths that rule interactions of PCS and IS with HSA, and those results can assist the development of therapeutics strategies to increase the removal of these compounds from people committed by chronic kidney disease (CKD).

Keywords: NMR STD. ITC. Intermolecular interactions. Ligands. Proteins.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. ESTRUTURAS DAS TOXINAS URÊMICAS..... | 16 |
| FIGURA 2. DIAGRAMAS DE NÍVEL DE ENERGIA E DIFERENÇAS DE POPULAÇÃO PARA DOIS SPINS S E I, QUE COMPARTILHAM UM ACOPLAMENTO DIPOLAR..... | 22 |
| FIGURA 3. RELAÇÃO DO AUMENTO DA INTENSIDADE DO SINAL PROVENIENTE DO NOE (η) PELO PRODUTO $\omega_0\tau_c$ | 24 |
| FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DO EXPERIMENTO DE RMN STD. | 28 |
| FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DO EXPERIMENTO DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC)..... | 32 |
| FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO DO APARATO DE ITC, DADOS BRUTOS DE UM EXPERIMENTO E A ISOTERMA DE LIGAÇÃO AJUSTADA COM O MODELO DE <i>ONE SET OF SITES</i> | 33 |
| FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO DO METABOLISMO DAS TOXINAS URÊMICAS (PCS E IS) NO SISTEMA BIOLÓGICO. | 36 |
| FIGURA 8. ESTRUTURA DA HSA..... | 39 |
| FIGURA 9. ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS PRESENTES NO MEDICAMENTO ALBUREX®..... | 48 |
| FIGURA 10. ESPECTROS DE RMN DE ^1H DA HSA ANTES DA PURIFICAÇÃO. (A) <i>cpmgpr1d</i> COM $\tau = 200$ ms e (B) <i>zgesgp</i> (600 MHz, 25 °C, D_2O). .. | 49 |
| FIGURA 11. ESPECTROS DE RMN DE ^1H DA HSA DEPOIS DA PURIFICAÇÃO. (A) <i>cpmgpr1d</i> COM $\tau = 200$ ms e (B) <i>zgesgp</i> (600 MHz, 25 °C, D_2O). | 49 |
| FIGURA 12. ESPECTRO DE DC DA HSA purificada (pH 7,2, 50 mM DE PBS, 50 MM DE NaCl, 25 °C). | 50 |
| FIGURA 13. VALORES DE ELIPTICIDADE MOLAR RESIDUAL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA HSA purificada (50 mM DE PBS (pH 7,2), 50 mM DE NaCl). | 51 |
| FIGURA 14. ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO PCS (600 MHz, 25 °C, D_2O). | 52 |
| FIGURA 15. MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C HSQC DO PCS (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz, 25 °C, D_2O). | 53 |
| FIGURA 16. ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DO PCS (150 MHz, 25 °C, D_2O). | 53 |
| FIGURA 17. ESPECTRO DE MASSAS DO PCS (m/z 187,08)..... | 54 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 18. ESPECTROS DE RMN STD DO IS VARIANDO A FREQUÊNCIA DE <i>OFFSET</i> NO ESPECTRO <i>ON-RESONANCE</i> (600 MHz, 25 °C, D ₂ O, pH 7,2). | 55 |
| FIGURA 19. ESPECTROS DE RMN STD DO IS VARIANDO A TRAVA DE SPIN (600 MHz, 25 °C, D ₂ O, pH 7,2). | 56 |
| FIGURA 20. ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DO PCS COM E SEM A PRESENÇA DA HSA (600 MHz, 25 °C, D ₂ O). | 57 |
| FIGURA 21. ESPECTROS DE RMN DE ¹ H DO IS COM E SEM A PRESENÇA DA HSA (600 MHz, 25 °C, D ₂ O). | 57 |
| FIGURA 22. EXEMPLIFICAÇÃO DA OBTENÇÃO DO ESPECTRO DE RMN STD DO PCS NA PRESENÇA DA HSA (600 MHz, 25 °C, D ₂ O, 50 mM PBS, 50 mM DE NaCl). | 58 |
| FIGURA 23. MAPEAMENTO DO EPÍTOPO DE LIGAÇÃO DO PCS E IS A PARTIR DOS EXPERIMENTOS DE RMN STD..... | 60 |
| FIGURA 24. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O A _{STD0[L]} EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO PCS (50 mM DE PBS, 50 mM DE NaCl, 25 °C). | 61 |
| FIGURA 25. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O A _{STD0[L]} EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO IS (50 mM DE PBS, 50 mM DE NaCl, 25 °C). | 62 |
| FIGURA 26. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O A _{STD0[L]} EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO PCS (50 mM DE PBS, 50 mM DE NaCl, 37 °C). | 64 |
| FIGURA 27. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O A _{STD0[L]} EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO PCS . (50 mM DE PBS, 200 mM DE NaCl, 25 °C). | 64 |
| FIGURA 28. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O A _{STD0[L]} EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO IS (50 mM DE PBS, 50 mM DE NaCl, 37 °C). | 65 |
| FIGURA 29. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O A _{STD0[L]} EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO IS (50 mM DE PBS, 200 mM DE NaCl, 25 °C). | 66 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 30. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O $A_{STD0[L]}$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO PCS (50 mM DE PBS, 50 mM DE NaCl, 25 °C). | 67 |
| FIGURA 31. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O $A_{STD0[L]}$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO IS (50 mM DE PBS, 50 mM DE NaCl, 25 °C). | 68 |
| FIGURA 32. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O $A_{STD0[L]}$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO PCS (2 mM DE DIAZEPAM; 50 mM DE PBS, 50 mM DE NaCl, 25 °C). | 69 |
| FIGURA 33. CURVAS DE ITC E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE PCS (10 mM) NA SOLUÇÃO DE HSA (0,1 mM), pH 7,2 À 37 °C. TODOS OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA. | 71 |
| FIGURA 34. CURVAS DE ITC E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE IS (30 mM) NA SOLUÇÃO DE HSA (0,1 mM), pH 7,2 À 37 °C. TODOS OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA. | 71 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1. CONDIÇÕES GERAIS UTILIZADAS PARA O EXPERIMENTO DE TITULAÇÃO POR RMN STD | 45 |
| TABELA 2. MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS RELATIVOS AOS VALORES DE A_{STD} PARA DIFERENTES TEMPOS DE SATURAÇÃO E PARA UM LIMITE DE TEMPO DE SATURAÇÃO QUE TENDE A ZERO (A_{STD0}) | 59 |
| TABELA 3. CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO (K_d) CALCULADAS UTILIZANDO OS VALORES DE A_{STD0} PARA O PCS E IS (50 mM PBS, 50 mM DE NaCl, 25 °C) | 62 |
| TABELA 4. CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO (K_d) CALCULADAS UTILIZANDO OS VALORES DE A_{STD0} PARA O PCS E IS | 66 |
| TABELA 5. CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO (K_d) CALCULADAS UTILIZANDO OS VALORES DE A_{STD0} PARA O PCS E IS | 68 |
| TABELA 6. CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO (K_d) CALCULADAS UTILIZANDO OS VALORES DE A_{STD0} DO PCS | 70 |
| TABELA 7. PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DO ESTUDO DE INTERAÇÃO ENTRE HSA E AS TOXINAS URÊMICAS PCS E IS OBTIDOS PELA TÉCNICA DE ITC..... | 72 |

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ATPase – Enzima adenosinatrifosfatases

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

DC – Dicroísmo circular

DEEP-STD – *Differential Epitope Mapping Saturation Transfer Difference*

DRC – Doença renal crônica

EM – Espectrometria de massas

ESI – *Electrospray ionization*

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial fosforilado

FID – *Free Induction Decay*

HSQC – *Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*

HSA – Albumina sérica humana

ITC – Calorimetria de Titulação Isotérmica

IS – Indoxil sulfato

K_d – Constante de dissociação

NADPH – Enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NOE – Efeito Nuclear Overhauser

NS – Número de transientes

OATs – Transportadores de ânions orgânicos

PBS – Tampão fosfato

PC – *p*-Cresol

PCS – *p*-Cresil sulfato

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

rpm – Rotações por minuto

STD – *Saturation Transfer Difference*

TMSP-*d*4 – 2,2,3,3-D₄-trimetilsililpropionato de sódio tetradeuterado

tr-NOE – *Transferred Nuclear Overhauser Effect*

WaterLOGSY – Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy

LISTA DE SÍMBOLOS

[L] – Concentração do ligante

[P] – Concentração da proteína

[θ] – Elipticidade residual molar média

α_{STD} – Fator de amplificação máximo

γ – Razão giromagnética

δ – Deslocamento químico

η – Magnitude do efeito NOE

θ – Grau de elipticidade

$\vec{\mu}$ – Momento magnético do spin nuclear

ν – Frequência angular ou velocidade angular

ρ_{IS} – Taxa de relaxação longitudinal dipolar total do spin I

σ_{IS} – Taxa de relaxação cruzada para os dois spins

τ_c – Tempo de correlação

ω – Frequência angular ou velocidade angular

ω_0 – Frequência do espectrômetro

A_{STD} – Fator de amplificação de STD

$A_{STD0[L]}$ – Fator de amplificação STD inicial para determinada concentração do ligante

B_0 – Campo magnético estático externo

ΔG – Variação da energia de Gibbs

ΔH – Variação de entalpia

ΔS – Variação de entropia

d – duplete

$d1$ – Tempo de espera antes de cada aquisição

$d20$ – Tempo de saturação

$d29$ – Trava de spin

C – Concentração

h – Constante de Planck

Hz – Hertz

I – Número quântico de spin nuclear

I – Intensidade do sinal no espectro na presença do efeito de NOE

I_0 – Intensidade do sinal no espectro de referência

I_{STD} – Intensidade do espectro STD

I_{sat} – Intensidade do sinal no espectro saturado

J – Constante de acoplamento escalar

K_a – Constante da associação

kDa – Kilodaltons

k_{sat} – Fator relacionado às propriedades de relaxação de um determinado hidrogênio que mede a velocidade de saturação do sinal no experimento de STD

l – Comprimento ótico

M – Massa molar

m/z – Razão massa carga

n – Estequiometria de reação

rad s^{-1} – Radianos por segundo

STD_0 – Fator de amplificação STD inicial

STD^{\max} – Assíntota da curva de STD

\vec{P} – Momento angular do spin nuclear

T_1 – Relaxação longitudinal ou spin-rede

T_{1p} – Constante de tempo para o decaimento da magnetização ao longo do campo de radiofrequência oscilante aplicado durante a trava de spin

T_2 – Relaxação transversal ou spin-spin

t_{sat} – Tempo de saturação

W_0 – Transições de zero quantum

W_1 – Transições de single quantum

W_2 – Transições de duplo quantum

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 A RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) | 17 |
| 1.1.1 Teoria básica da RMN | 18 |
| 1.1.2 A RMN aplicada ao estudo das interações proteína-ligante | 19 |
| 1.1.3 Efeito Nuclear Overhauser (NOE) | 20 |
| 1.1.4 O experimento de Saturation Transfer Difference (STD) | 25 |
| 1.2 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC) | 30 |
| 1.3 A DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC) | 34 |
| 1.3.1 Toxinas urêmicas e albumina sérica humana | 34 |
| 2 OBJETIVOS | 41 |
| 2.1.1 Objetivo geral | 41 |
| 2.1.2 Objetivos específicos | 41 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 42 |
| 3.1 INFORMAÇÕES GERAIS | 42 |
| 3.2 PURIFICAÇÃO DA ALBUMINA HUMANA SÉRICA (HSA) | 43 |
| 3.3 SÍNTESE DO <i>P</i> -CRESIL SULFATO (PCS) | 43 |
| 3.4 PREPARO DA SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO (PBS) | 44 |
| 3.5 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR (DC) | 44 |
| 3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES DE RMN | 45 |
| 3.7 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ¹ H | 45 |
| 3.8 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN STD | 46 |
| 3.9 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES DE ITC | 47 |
| 3.10 ANÁLISES DE ITC | 47 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 48 |
| 4.1 PURIFICAÇÃO DA ALBUMINA HUMANA SÉRICA (HSA) | 48 |
| 4.2 SÍNTESE DO <i>P</i> -CRESIL SULFATO (PCS) | 52 |
| 4.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO EXPERIMENTO DE RMN STD | 54 |
| 4.4 MAPEAMENTO DO EPÍTOPO DO LIGANTE POR RMN STD | 56 |
| 4.5 ESTUDOS DE TITULAÇÃO POR RMN STD | 60 |
| 4.5.1 Determinação das constantes de dissociação das toxinas urêmicas (PCS e IS) ligadas a albumina humana | 60 |

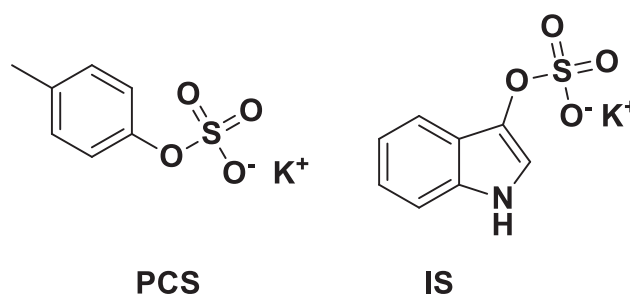
| | |
|--|-----------|
| 4.5.2 Avaliação da influência da temperatura e do aumento da força iônica nas constantes de dissociação (K_d) do PCS e IS ligados a HSA..... | 63 |
| 4.5.3 Avaliação da influência de contaminantes nas constantes de dissociação (K_d) do PCS e IS ligados a HSA..... | 67 |
| 4.5.4 Caracterização do sítio de ligação do PCS | 69 |
| 4.6 ESTUDOS DE TITULAÇÃO POR ITC | 70 |
| 4.6.1 Determinação das constantes de associação das toxinas urêmicas PCS e IS ligadas a albumina humana..... | 70 |
| 5 CONCLUSÃO | 74 |
| 5.1 PERSPECTIVAS..... | 75 |
| 6 REFERÊNCIAS..... | 76 |

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é um importante e crescente desafio enfrentado pelos sistemas de saúde, devido ao constante aumento de sua incidência em todas as faixas etárias (JHA et al., 2013). Essa síndrome é causada por inúmeras doenças que têm em comum a redução progressiva da capacidade de filtração glomerular, que leva a um acúmulo de compostos orgânicos, resultando em insuficiência renal crônica (BARRETO et al., 2014). Esses compostos são chamados de "toxinas urêmicas" ou "solutos de retenção urêmica" e em organismos saudáveis são excretados pelos rins. Entretanto, suas concentrações aumentam gradualmente com o progresso da DRC, causando diversos danos em vários órgãos e tecidos do corpo, sobretudo o sistema cardiovascular (BARRETO et al., 2014).

As toxinas urêmicas pertencentes à classe caracterizada pela ligação a proteínas plasmáticas não são facilmente removíveis através dos processos convencionais de diálise. Embora a grande maioria delas tenha baixa massa molar, ex: o *p*-cresil sulfato (PCS) e indoxil sulfato (IS) (FIGURA 1), o complexo resultante da ligação toxina-proteína forma uma molécula grande demais para atravessar os poros das membranas, sendo eliminada apenas uma pequena parcela que se mantém na forma livre (ITO; YOSHIDA, 2014; LEKAWANVIJIT, 2018).

FIGURA 1. ESTRUTURAS DAS TOXINAS URÊMICAS.



Os estudos indicam que o PCS e o IS contribuem para o desenvolvimento de outras doenças em pacientes com DRC, bem como podem ser responsáveis pelo aumento da morbidade cardiovascular desses pacientes (GRYP et al., 2017; LEONG; SIRICH, 2016).

Uma vez que as interações entre essas toxinas urêmicas e as proteínas plasmáticas podem regular e modular a função das proteínas, bem como afetar a

eliminação desses compostos, o estudo dessas interações é particularmente útil para compreender o impacto desses complexos nos mais diversos processos biológicos que ocorrem nas células (ANGLISTER; SRIVASTAVA; NAIDER, 2016).

Atualmente, há um crescente interesse em investigar os processos dinâmicos das interações proteína-ligante, a fim de melhorar a compreensão fundamental dos seus mecanismos de atuação (KARPLUS; KURIYAN, 2005; KARPLUS, 2010). Essas interações podem ser estudadas por várias técnicas biofísicas (FECHNER et al., 2014), incluindo Calorimetria de Titulação Isotérmica (KABIRI; UNSWORTH, 2014), Ultracentrifugação Analítica (HARDING; ROWE, 2010), Microbalança de Cristal de Quartzo (FEE, 2013a), Ressonância Plasmônica de Superfície (FEE, 2013b), Espectrometria de Massas (KOOL et al., 2011), Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível (SURYAWANSHI et al., 2016), Espectroscopia de Fluorescência (SLAUGHTER; LI, 2010), Dispersão de Raios X de Baixo Ângulo (PERRY; TAINER, 2013), Microscopia de Força Atômica (WHITED; PARK, 2014) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (LIAN, 2013).

Portanto, o conhecimento do funcionamento das interações das toxinas urêmicas ligadas às proteínas plasmáticas pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para aumentar a remoção desses compostos do organismo, com potencial impacto na diminuição na progressão da DRC.

1.1 A RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A RMN é uma das mais poderosas e importantes ferramentas espectroscópicas utilizadas para a investigação de propriedades físico-químicas em sistemas complexos, podendo ser aplicada tanto na elucidação estrutural de moléculas de baixa massa molar e macromoléculas, como também no estudo das interações entre essas moléculas.

Desde o seu surgimento após a II Guerra Mundial (1945-1956), quando Felix Bloch e Edward Purcell observaram, independentemente, como a água (BLOCH, 1946) e a parafina (PURCELL; TORREY; POUND, 1946) absorviam radiofrequência, a RMN vem passando por transformações que proporcionaram maior versatilidade e ampliação de sua aplicação.

1.1.1 Teoria básica da RMN

Os núcleos de todos os átomos podem ser caracterizados por um número quântico de spin nuclear (I), que pode ter valor superior ou igual a zero, sendo essa propriedade fundamental para o fenômeno da RMN. De acordo com a física clássica, todas as partículas que possuem uma carga em movimento contínuo (momento angular) podem gerar um momento magnético. Portanto, o momento magnético do spin nuclear ($\vec{\mu}$) pode ser definido de acordo com a EQUAÇÃO 1:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{P} \quad \text{EQUAÇÃO 1}$$

onde, \vec{P} é o momento angular do spin nuclear e γ é a constante de proporcionalidade denominada razão giromagnética que é diferente para cada isótopo de um elemento químico (CLARIDGE, 2009).

Ambos os momentos angular e magnético de spin nuclear são grandezas vetoriais e possuem magnitude e orientação espacial quantizadas. Dessa forma, quando um determinado núcleo é colocado em um campo magnético estático externo (B_0), os momentos magnéticos se alinham em relação ao campo em um número discreto de orientações. Segundo a mecânica clássica, o campo magnético estático externo (B_0) impõe um torque no momento magnético de spin nuclear, que passa a fazer uma trajetória circular em torno do campo B_0 . Este movimento é denominado precessão ou, mais especificamente precessão de Larmor (CLARIDGE, 2009). Essa taxa de precessão é definida pela velocidade angular (ω rad s⁻¹ ou ν Hz) conforme a EQUAÇÃO 2:

$$\omega = -\gamma B_0 \text{ ou } \nu = \frac{-\gamma B_0}{2\pi} \quad \text{EQUAÇÃO 2}$$

A condição de ressonância ocorre quando o núcleo muda seu estado de spin, impulsionado pela absorção de um quantum de energia. Isso ocorre mediante a aplicação de um pulso de curta duração e alta potência na região da frequência de Larmor dos núcleos a serem analisados. A energia envolvida nesse processo pode ser descrita como (EQUAÇÃO 3):

$$\Delta E = h\nu = \frac{\hbar\gamma B_0}{2\pi} \quad \text{EQUAÇÃO 3}$$

onde h é a constante de Planck.

Após esse pulso, os spins excitados passam a relaxar por dois mecanismos distintos e simultâneos: a relaxação longitudinal ou spin-rede (T_1) e a relaxação transversal ou spin-spin (T_2). É durante esse tempo que se observa o sinal induzido pela magnetização dos spins, o FID (*Free Induction Decay*), que contém todas as frequências espectrais sobrepostas (CLARIDGE, 2009).

1.1.2 A RMN aplicada ao estudo das interações proteína-ligante

A RMN é uma técnica bastante versátil e poderosa para o estudo da dinâmica das interações proteína-ligante, especialmente porque além de fornecer informações estruturais, possibilita também a aquisição de informações quantitativas do epítipo da proteína e do ligante (a superfície de contato da macromolécula-ligante) (TAKEUCHI; WAGNER, 2006; FURUKAWA et al., 2016).

Com relação à análise quantitativa, a RMN tem sido utilizada para determinar a constante de dissociação (K_d) das interações proteína-ligante (FIELDING, RUTHERFORD; FLETCHER, 2005; FIELDING, 2007), em particular, para investigar interações relativamente fracas ($K_d > 10 \mu\text{M}$), que são difíceis de serem investigadas por outros métodos biofísicos (ROWE, 2011).

As abordagens experimentais envolvendo RMN que vêm sendo utilizadas nessa área podem ser divididas em dois grupos: o primeiro que envolve a análise do espectro de RMN da proteína e, o segundo no qual os espectros de RMN do ligante são analisados (AGUIRRE; CALA; KRIMM, 2015).

A primeira abordagem monitora as mudanças dos deslocamentos químicos dos sinais das proteínas causadas pelas interações com o ligante e a estrutura 3D do complexo proteína-ligante pode ser resolvida recorrendo aos experimentos heteronucleares realizados com amostras de proteínas marcadas isotopicamente (^{13}C , ^{15}N , ^2H). As principais desvantagens dessa abordagem são o tempo experimental e a necessidade da obtenção de proteínas com alta estabilidade e solubilidade (CALA; GUILLIÈRE; KRIMM, 2014).

Por outro lado, a abordagem que analisa as propriedades dos ligantes é mais interessante, devido a maior sensibilidade e por fornecer espectros de RMN mais simples e resolvidos, quando comparados aos espectros de proteínas (FIGUEIREDO; MARSAIOLI, 2007). Através dessa abordagem, o epítipo do ligante (a superfície de contato da macromolécula-ligante) é obtido por meio dos experimentos de RMN usando o deslocamento químico, relaxação longitudinal (T_1), relaxação transversal (T_2) (através da largura de linha), difusão e transferência de magnetização (FIELDING, 2007). A transferência de magnetização através do Efeito Nuclear Overhauser (NOE) é considerado o state-of-the-art no que diz respeito ao estudo de interação macromolécula-ligante sobre o ponto de vista do ligante. Dentre os experimentos que se baseiam no NOE destacam-se o *Transferred Nuclear Overhauser Effect* (tr-NOE), *Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy* (WaterLOGSY) e *Saturation Transfer Difference* (STD).

1.1.3 Efeito Nuclear Overhauser (NOE)

O Efeito Nuclear Overhauser (NOE) foi descrito pela primeira vez há mais de 60 anos. O NOE é a mudança na área do sinal de um núcleo causada pela saturação do sinal de um segundo núcleo (OVERHAUSER, 1953). Essa alteração é resultado da transferência de polarização via mecanismos de relaxação spin-rede entre núcleos que apresentam acoplamentos dipolares. A magnitude dessa interação pode ser expressa como uma diferença relativa de intensidades no equilíbrio (I_0), e na presença do efeito de NOE (I) (EQUAÇÃO 4).

$$\eta_I\{S\} = \frac{I - I_0}{I_0} \quad \text{EQUAÇÃO 4}$$

A equação 4 representa o efeito NOE sentido pelo núcleo I quando o núcleo S é perturbado, sendo I e I_0 a intensidade do sinal na presença e ausência de irradiação do núcleo S.

Considerando um sistema homonuclear de dois núcleos I e S de spin $\frac{1}{2}$ que não apresentam ligações químicas entre si, logo não partilham acoplamento escalar ($J_{IS} = 0$ Hz), no entanto encontram-se suficientemente próximos espacialmente para que ocorra entre ambos um acoplamento dipolar (acoplamento espacial entre dois

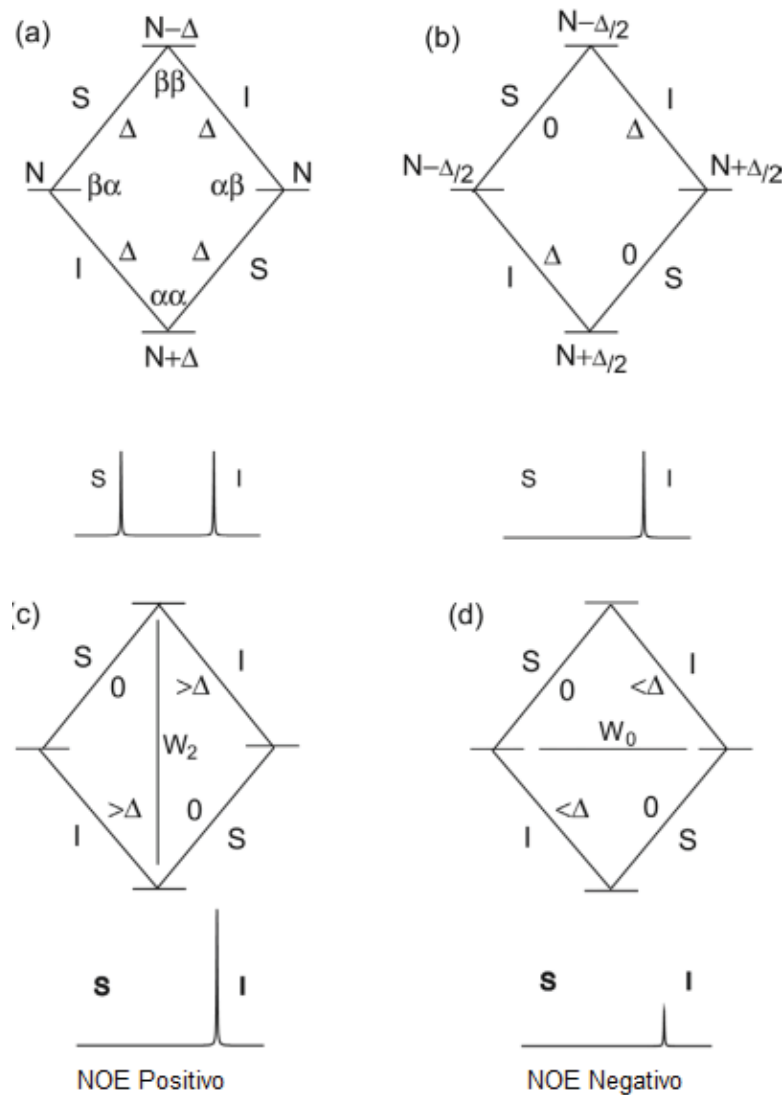
spins nucleares através da sua componente magnética) (FIGURA 2a) (CLARIDGE, 2009).

Na parte superior da FIGURA 2b é possível observar que ocorre uma saturação dos spins nucleares S, ou seja, a diferença populacional nos dois estados energéticos (α_S e β_S) passou a ser nula (CLARIDGE, 2009). Através da relaxação longitudinal dos spins, o sistema irá procurar atingir um novo equilíbrio térmico. As vias pelas quais irá ocorrer a relaxação de spin são:

1. Transições de duplo quantum (W_{2IS}) que representam a probabilidade de ocorrer transições entre níveis energéticos $\beta\beta$ - $\alpha\alpha$. Com o intuito de restabelecer o equilíbrio térmico das populações dos spins nucleares S, os spins nucleares nos estados $\beta\beta$ irão relaxar para $\alpha\alpha$, promovendo um aumento da diferença entre as populações I (α_I e β_I), e consequentemente será observado um aumento da intensidade da ressonância do núcleo I. Este fenômeno é denominado de NOE positivo.

2. Transições de zero quantum (W_{0IS}), que descrevem a probabilidade de ocorrer transições entre níveis energéticos $\alpha_I\beta_S$ e $\alpha_S\beta_I$. Analogamente ao mecanismo descrito anteriormente, haverá relaxação de spin de $\alpha_S\beta_I$ para $\alpha_I\beta_S$, promovendo consequente uma diminuição das diferenças de populações entre os distintos estados energéticos relativos aos spins nucleares de I. Este fenômeno irá promover uma diminuição da intensidade da ressonância associada a esse núcleo - NOE negativo.

FIGURA 2. DIAGRAMAS DE NÍVEL DE ENERGIA E DIFERENÇAS DE POPULAÇÃO PARA DOIS SPINS S E I, QUE COMPARTILHAM UM ACOPLAMENTO DIPOLAR.



FONTE: Adaptado de CLARIDGE, 2009.

LEGENDA: (a) em equilíbrio, (b) após saturação instantânea dos spins S, (c) após relaxamento via processos W_2 e (d) após relaxamento via processos W_0 . abaixo de cada um estão os espectros correspondentes.

A equação de Solomon para o NOE resume o que até agora foi estabelecido, pois considera todas as várias taxas de relaxação envolvidas (EQUAÇÃO 5):

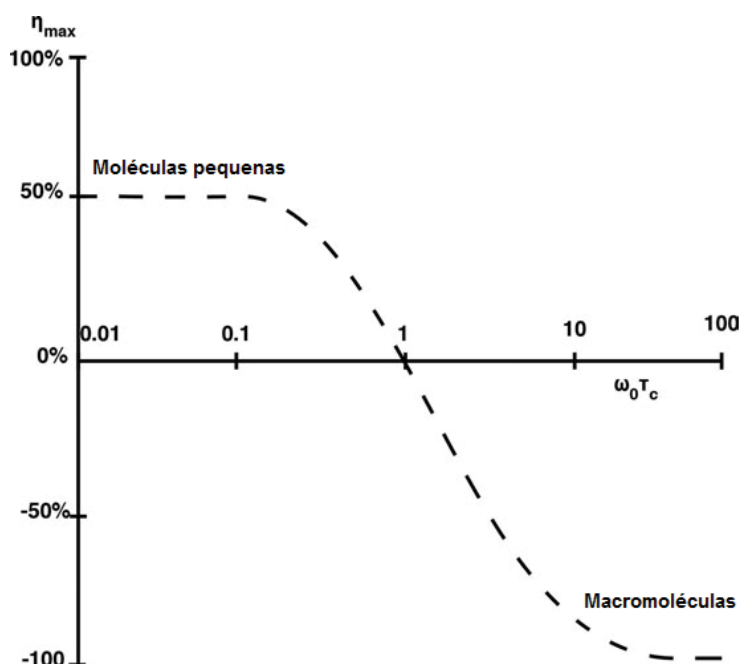
$$\eta_I\{S\} = \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \left[\frac{W_2 - W_0}{W_0 + 2W_1' + W_2} \right] \equiv \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \left[\frac{\rho_{IS}}{\rho_{IS}} \right] \quad \text{EQUAÇÃO 5}$$

onde σ_{IS} : representa a taxa de relaxação cruzada para os dois spins e ρ_{IS} : taxa de relaxação longitudinal dipolar total do spin I.

O sinal do NOE irá depender da eficiência dos processos de relaxação cruzada (σ_{IS}). Quando os processos de relaxação através das transições W_2 prevalecem, o sinal do NOE assume magnitude positiva e quando a relaxação ocorre por transições W_0 a função assume magnitude negativa. Vale-se ressaltar que durante o experimento a transição W_1^S encontra-se saturada, não podendo ocorrer relaxação por esta via, entretanto a via de relaxação W_1^I encontra-se livre podendo reduzir ou até mesmo anular o efeito NOE.

Em outras palavras, o NOE está intrinsicamente ligado ao tempo de correlação (T_c) das moléculas ligadas e livres. Portanto, para pequenas moléculas que se movimentam rapidamente ($\omega_0 T_c < 1$), são observados NOE positivos com um aumento máximo de sinal de 50%. Em contrapartida, para grandes moléculas com movimentos lentos ($\omega_0 T_c > 1$), um NOE negativo máximo de -100% é observado. Já para aquelas moléculas que apresentam movimentos intermediários com o produto $\omega_0 T_c \cong 1$, os efeitos de NOE são muito pequenos, praticamente nulos (FIGURA 3) (AGUIRRE; CALA; KRIMM, 2015).

FIGURA 3. RELAÇÃO DO AUMENTO DA INTENSIDADE DO SINAL PROVENIENTE DO NOE (η) PELO PRODUTO $\omega_0\tau_c$.

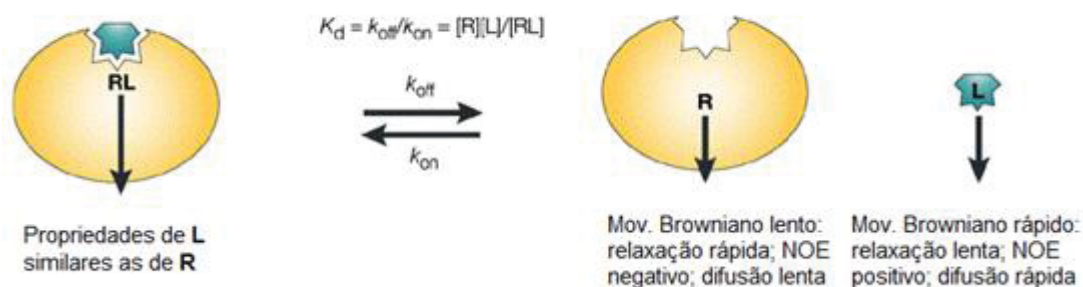


Fonte: Adaptado de AGUIRRE; CALA; KRIMM, 2015.

LEGENDA: ω_0 : frequência do espectrômetro e τ_c : tempo de correlação da molécula.

Em outras palavras, quando uma molécula pequena se liga a uma macromolécula, essa assimila características intrínsecas da macromolécula e adota o NOE correspondente, ou seja, passa a apresentar fortes NOEs negativos, que refletem a conformação do ligante no estado complexado (ESQUEMA 1). Dessa forma, a ligação de um ligante a um receptor macromolecular pode facilmente ser diferenciado através da fase e da intensidade do NOE observado (CARLOMAGNO, 2005).

ESQUEMA 1. PROPRIEDADES DE RMN DE MACROMOLÉCULAS E MOLÉCULAS PEQUENAS



FONTE: Adaptado de PELLECCIA; SEM; WÜTHRICH, 2002.

Nos experimentos de tr-NOE são utilizados pulsos de alta potência para alterar o estado fundamental de equilíbrio dos spins nucleares que durante o tempo de mistura (τ_m) retornam ao equilíbrio como consequência do processo de relaxação. Os tr-NOEs intramoleculares são usualmente muito maiores do que os intermoleculares. Sendo os tr-NOEs intramoleculares a chave para definir as conformações do ligante complexado, enquanto os tr-NOEs intermoleculares, permitem a determinação da orientação do ligante complexado no sítio ativo da proteína (MOSELEY; CURTO; KRISHNA, 1995)

1.1.4 O experimento de Saturation Transfer Difference (STD)

Dentre os experimentos de transferência de NOE, o de *Saturation Transfer Difference* (STD) é o mais difundido, provavelmente, por possibilitar a identificação do epítipo de ligação do ligante, bem como, as constantes de dissociação dos complexos (MAYER; MEYER, 2001).

Inicialmente, a RMN STD foi aplicada no estudo da interação entre carboidratos e a proteína aglutinina do gérmen de trigo e representa um dos métodos mais sensíveis e populares de triagem de ligantes (MAYER; MEYER, 1999). Recentes aplicações desse experimento demonstraram sua versatilidade. Fernandes e colaboradores (2014) aplicaram a RMN STD para investigar a associação entre antocianinas e carboidratos. Em outro trabalho, Ko e colaboradores (2015) caracterizaram o processo de inibição da enzima

adenosinatrifosfatases (ATPase) pela interação com a molécula apoptozol que resulta na indução do processo de apoptose em células carcinogênicas.

Além disso, foram observados excelentes resultados da aplicação da RMN STD em estudos de interações envolvendo aminoácidos imobilizados em suporte sólidos com nucleotídeos (CRUZ et al., 2013), drogas anti-inflamatórias não esteroidais e enzimas (VIEGAS et al., 2011a), polifenóis e proteínas salivares (GARCÍA-ESTÉVEZ et al., 2017; BRANDÃO et al., 2017), hidrogéis (RAMALHETE et al., 2017), bem como, peptídeos e receptores heterodiméricos de adesão da superfície celular (GUZZETTI et al., 2017).

A RMN STD é uma técnica atrativa devido à diversidade de informações que podem ser obtidas. Por exemplo, uma amostra contendo uma mistura de potenciais ligantes pode ser preparada, e as moléculas que interagem com determinado receptor macromolecular podem ser identificadas simplesmente pela presença de sinais no espectro de RMN STD (GAO et al., 2014).

Outra característica dessa interessante ferramenta é a possibilidade de determinar o epítipo de ligação do ligante através das intensidades relativas dos sinais presentes no espectro de RMN STD, o qual fornece informação sobre a posição relativa do ligante em relação ao sítio de ligação (ANGULO et al., 2008; MAYER; MEYER, 2001). Isto pode fornecer informações importantes para a determinação da estrutura 3D do complexo proteína-ligante quando combinadas com as ferramentas da modelagem molecular, uma vez que os modelos tridimensionais podem ser validados comparando os dados experimentais de RMN STD com os previstos a partir do modelo (KRISHNA; JAYALAKSHMI, 2008). Avanços recentes, permitem ainda mapear o tipo de resíduo proteico (polar, alifático ou aromático) próximo a diferentes regiões do ligante através do experimento de *Differential Epitope Mapping Saturation Transfer Difference* (RMN DEEP-STD) (MONACO et al., 2017), auxiliando ainda mais a determinação estrutural do complexo proteína-ligante.

Outras vantagens da técnica de RMN STD incluem a menor susceptibilidade a falsos positivos em comparação com outras técnicas espectroscópicas (HARNER; FRANK; FESIK, 2013), e quando comparadas com experimentos de RMN baseados no receptor requer uma quantidade relativamente pequena de proteína sem marcação isotópica e sem limite de tamanho superior para o receptor (> 30 kDa).

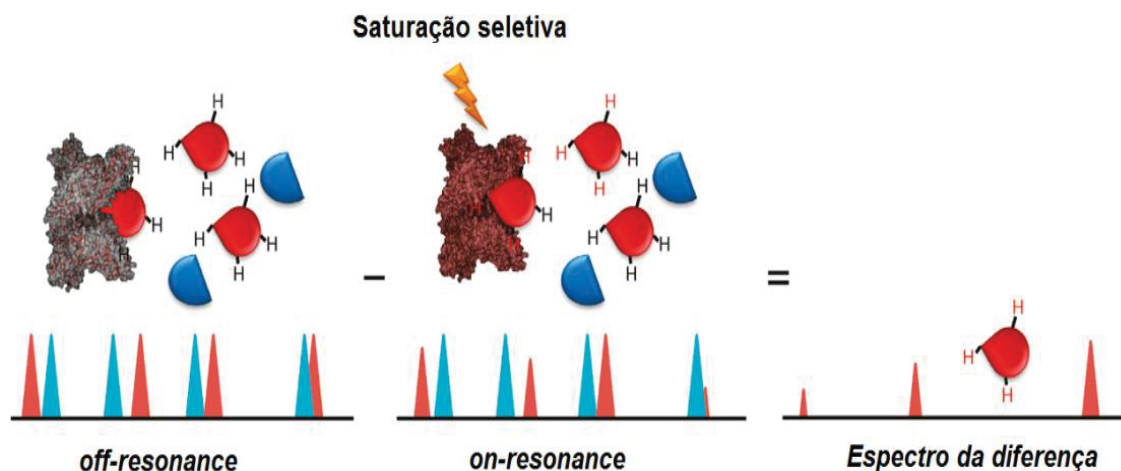
Normalmente, os experimentos de RMN STD são realizados utilizando concentrações em milimolares de ligante e micromolares de proteína. Os experimentos simples de triagem podem variar de 10 minutos a 1 hora de duração, até 1 dia para determinação da constante de dissociação (K_d). Além disso, normalmente não é possível o estudo de complexos com alta afinidade (K_d em nM), uma vez que esses complexos geralmente possuem cinéticas desfavoráveis para serem observados no experimento de RMN STD (WALPOLE et al., 2019).

O experimento de RMN STD consiste basicamente na aquisição da diferença de dois espectros (FIGURA 4). No primeiro experimento (*on-resonance*), a magnetização dos hidrogênios do receptor é seletivamente saturada via um trem de pulsos Gaussianos (sequência de pulsos com formato Gaussiano). Devido à difusão de spin, a saturação se propaga rapidamente pelos hidrogênios do receptor via relaxação cruzada intramolecular. Se houver a interação com o ligante, a saturação é transferida da proteína para os hidrogênios do ligante que estão na interface receptor-ligante via relaxação cruzada intermolecular. Em seguida, as moléculas do ligante que receberam a transferência de magnetização devido à interação com o receptor se dissociam e voltam para a solução onde seu estado saturado persiste por causa da pequena velocidade de relaxação longitudinal do mesmo (MEYER; PETERS, 2003).

Posteriormente, um experimento de referência (*off-resonance*) é obtido aplicando um trem de pulsos fora da janela espectral, onde nenhum sinal é perturbado. Os experimentos *on-resonance* e *off-resonance* são obtidos em um esquema alternado e subtraídos sequencialmente por meio da ciclagem de fase. O resultado da diferença dos espectros fornece somente os sinais dos ligantes que foram saturados (FIGURA 4) (MEYER; PETERS, 2003).

A intensidade dos sinais no espectro de STD correlaciona-se com a distância entre os hidrogênios do ligante e da proteína. Quanto mais próximos os hidrogênios do ligante estiverem da proteína, mais intenso é o sinal correspondente no espectro STD devido a transferência de magnetização mais eficiente (MEYER; PETERS, 2003).

FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DO EXPERIMENTO DE RMN STD.



FONTE: Adaptado de VIEGAS et al., 2011b.

LEGENDA: O equilíbrio entre o ligante livre e ligado ao receptor permite a transferência da magnetização intermolecular do receptor para a ligante.

O mapeamento do epítipo do ligante, normalmente, é realizado com base na amplificação da magnetização do sinal que é traduzida pelo fator de amplificação de STD (A_{STD}), assumindo que não depende do tempo de saturação escolhido (MAYER; MEYER, 2001) (EQUAÇÃO 6):

$$A_{STD} = \frac{I_0 - I_{SAT}}{I_0} \times \frac{[L]}{[P]} = \frac{I_{STD}}{I_0} \times \frac{[L]}{[P]} \quad \text{EQUAÇÃO 6}$$

onde, I_0 é a intensidade do sinal no espectro de referência (*off-resonance*) e I_{sat} é a intensidade do sinal no espectro saturado (*on-resonance*). Em outras palavras, para determinado excesso de ligante $[L]$ em relação a proteína $[P]$, utiliza-se a razão entre as intensidades do espectro STD ($I_{STD} = I_0 - I_{SAT}$) e o espectro de referência I_0 . Assim, o hidrogênio com o maior A_{STD} é igual a 100%, sendo os restantes normalizados em relação a este.

No entanto, as taxas de relaxação longitudinal significativamente diferentes dos hidrogênios do ligante podem produzir artefatos na definição do epítipo (MAYER; JAMES, 2004; YAN et al., 2003). Com o intuito de superar esses problemas Mayer e James (2004) propuseram a utilização do fator de amplificação

STD inicial (A_{STD0}), que pode ser calculado pelo ajuste das curvas de A_{STD} experimentais à uma função monoexponencial (EQUAÇÃO 7):

$$A_{STD(t_{sat})} = STD^{max} (1 - e^{-k_{sat} t_{sat}}) \quad \text{EQUAÇÃO 7}$$

onde $A_{STD(t_{sat})}$ é a área do sinal observado no espectro de STD; STD^{max} representa a assíntota da curva de STD; k_{sat} é um fator relacionado às propriedades de relaxação de um determinado hidrogênio que mede a velocidade de saturação do sinal no experimento de STD e t_{sat} é o tempo de saturação.

Assim, os valores de A_{STD0} são obtidos utilizando a seguinte equação:

$$A_{STD0} = \frac{\partial STD(t_{sat})}{\partial t_{sat}} \int_{t_{sat} \rightarrow 0} = STD^{max} \times k_{sat} A_{STD0} = STD^{max} \times k_{sat} \quad \text{EQUAÇÃO 8}$$

A determinação da constante de dissociação (K_d) por RMN é afetada por diferentes parâmetros experimentais, em particular, o tempo de saturação (t_{sat}) empregado, a intensidade do sinal no espectro STD e a concentração do receptor (ÂNGULO; ENRÍQUEZ-NAVAS; NIETO, 2010). Esses efeitos podem ser removidos por meio da construção de uma isoterma de ligação (Langmuir) como função da concentração do ligante na amostra pelos valores dos fatores de amplificação STD inicial (A_{STD0}) (ÂNGULO; ENRÍQUEZ-NAVAS; NIETO, 2010).

Dessa forma, os valores de A_{STD0} obtidos pela Equação 8 para diferentes concentrações do ligante são ajustados a Equação 9, análoga à bem estabelecida equação de velocidade da reação enzimática (v_0) de Michaelis-Menten (JOHNSON; GOODY, 2011):

$$A_{STD0[L]} = \frac{(\alpha_{STD}[L])}{(K_d + [L])} \quad \text{EQUAÇÃO 9}$$

onde $A_{STD0[L]}$ é o fator de amplificação STD inicial para determinada concentração do ligante, α_{STD} é o valor de A_{STD} máximo, $[L]$ é a concentração do ligante e K_d a constante de dissociação.

1.2 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC)

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) é uma das principais ferramentas analíticas utilizadas nos estudos de interação entre macromoléculas e ligantes. Essa técnica permite obter a constante da associação (K_a), a estequiometria de reação (n) e os parâmetros termodinâmicos, variação de entalpia (ΔH), variação de entropia (ΔS) e a energia de Gibbs (ΔG), em uma única medida. Além disso, é uma técnica robusta, de alta sensibilidade e não apresenta artefatos experimentais (FALCONER; COLLINS, 2011).

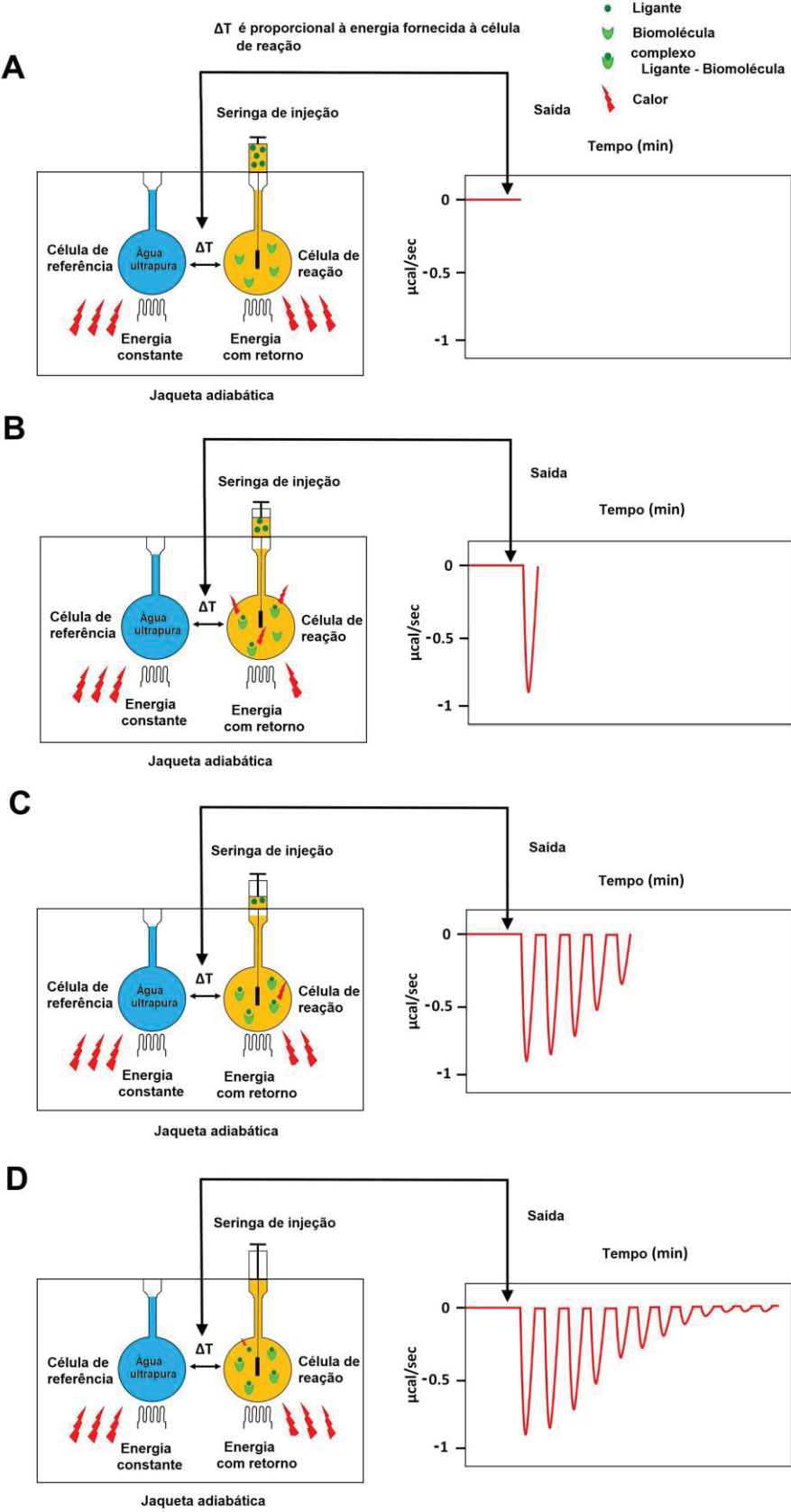
A aplicação dessa técnica tem apresentado excelentes resultados nas mais variadas áreas de estudos (FALCONER, 2016). Por exemplo, na avaliação do comportamento termodinâmico de complexos de coacervatos utilizados no desenvolvimento de novos produtos e o encapsulamento de compostos bioativos, como os ácidos graxos ômega-3 e a vitamina D3 (WATER et al., 2014; DONG et al., 2015; DIARRASSOUBA et al., 2015; ERATTE et al., 2015). Além disso, tem sido utilizada para a caracterização de interações moleculares, como proteínas-polissacarídeos, proteínas-nanopartículas, proteína-proteína, proteína-ligante, drogas-DNA e proteínas-DNA (GROLIER; DEL RÍO; 2009; FALCONER, 2016; CALLIES; DARANAS, 2016).

A técnica de ITC é baseada no princípio de compensação de calor. O equipamento é constituído por uma seringa de titulação e duas células iguais (uma célula de referência e outra de reação), que devem ser mantidas na mesma temperatura. A seringa de titulação é carregada com o titulante, a célula de reação é preenchida com a espécie a ser titulada e a célula de referência é preenchida com água ultrapura (FIGURA 5A).

O experimento é realizado por injeções sequenciais do titulante na célula de reação, com intervalos entre cada injeção. Durante a injeção da alíquota do titulante na célula de reação, a seringa de titulação homogeneiza o sistema e a reação se processa com absorção ou liberação de calor. Em seguida, os sensores do sistema registram a diferença de calor entre as células de reação/referência e acionam o sistema de aquecimento/refrigeração para manter as duas células sob a mesma temperatura, antes da próxima injeção (FIGURA 5B-C). Após algum tempo a espécie

titulada é totalmente saturada e o instrumento detecta somente a mudança de calor devido à diluição do titulante no solvente (FIGURA 5D).

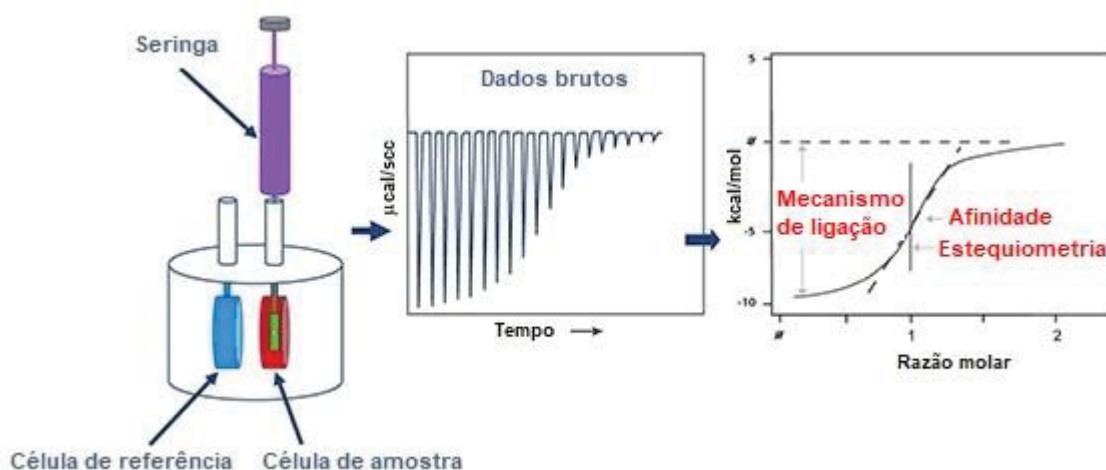
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DO EXPERIMENTO DE CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC).



FONTE: Adaptado de SAPONARO, 2018.

Os dados brutos obtidos no equipamento são as curvas de análise que representam o calor absorvido ou liberado a cada injeção em função do tempo (FIGURA 6). A área dos sinais observados nas curvas de ITC é plotada em função da razão molar gerando uma curva (isoterma de ligação) que permite a obtenção dos dados de variação da entalpia – ΔH (corresponde à intersecção das duas linhas assintóticas correspondentes para a formação de calor mínima e máxima), estequiometria da reação – n (controla a posição do ponto de inflexão da sigmoide) e constante de associação – K_a (correspondente à inclinação no ponto de inflexão) (BOUCHEMAL; MAZZAFERRO, 2012; NÚÑEZ et al., 2012; FRASCA, 2016) (FIGURA 6).

FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO DO APARATO DE ITC, DADOS BRUTOS DE UM EXPERIMENTO E A ISOTERMA DE LIGAÇÃO AJUSTADA COM O MODELO DE ONE SET OF SITES



FONTE: Adaptado de FRASCA, 2016.

1.3 A DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)

A doença renal crônica (DRC) é definida basicamente como a perda progressiva e irreversível da capacidade dos rins de filtrar o sangue e assim eliminar do organismo as substâncias orgânicas exógenas e endógenas (NEIRYNCK et al., 2013). Dessa forma, as concentrações dessas substâncias aumentam gradualmente com o progresso da DRC, interagindo negativamente com as várias funções biológicas. Nesse cenário, esses compostos são denominados solutos de retenção urêmica ou toxinas urêmicas. Por outro lado, o quadro clínico é caracterizado como estado urêmico ou uremia (literalmente, “urina no sangue”) (BARRETO et al., 2014).

A DRC está associada a um conjunto de complicações envolvendo vários sistemas de órgãos importantes, que incluem anemia, distúrbios minerais e ósseos, neuropatia periférica, disfunção cognitiva, aumento de infecções e desnutrição (YANG et al., 2011; BELLO et al., 2017).

Embora haja avanços significativos na terapia de diálise e na compreensão da fisiopatologia da DRC, a taxa anual de mortalidade de pacientes portadores de DRC é elevada devido principalmente as complicações relacionadas à doença cardiovascular decorrente do acúmulo das toxinas urêmicas (COHEN; HORL, 2012; HAUSER et al., 2008; RONCO; CLARK, 2018).

1.3.1 Toxinas urêmicas e albumina sérica humana

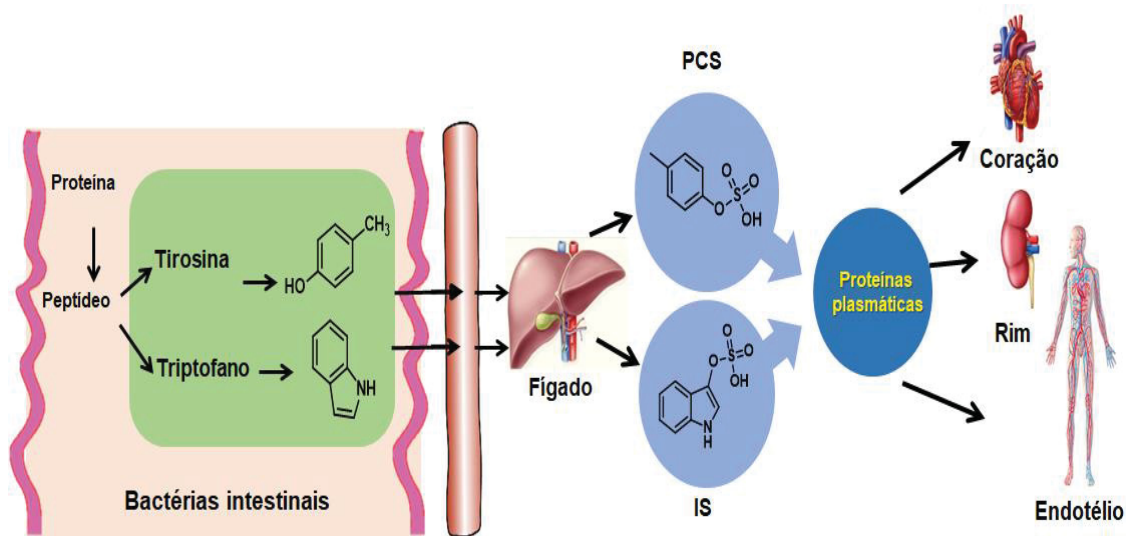
As toxinas urêmicas são substâncias orgânicas que em condições normais são excretadas pelos rins, mas que são retidas no organismo quando a função renal está prejudicada (COHEN et al., 2007). Além disso, algumas características precisam ser observadas para que uma substância seja denominada de toxina urêmica, dentre elas a quantificação em fluídos corporais; aumento de sua concentração e relação com um ou mais sintomas da uremia; bem como o decréscimo da concentração dessa toxina quando o paciente for tratado e obtiver uma melhora no quadro clínico da uremia e, por fim, deve-se observar os efeitos urêmicos semelhantes aos encontrados na uremia em ensaios realizados *in vivo* ou *in vitro* (GLASSOCK, 2008).

A classificação das toxinas urêmicas é realizada com base nas suas propriedades físico-químicas e remoção por diálise, de acordo com essas características elas podem ser divididas em três tipos (BARRETO et al., 2014):

- Moléculas livres com massa molar $\leq 500 \text{ g mol}^{-1}$ e solúveis em água. Por exemplo, a ureia e a creatinina que podem ser removidas facilmente por diálise;
- Moléculas médias com massa molar $> 500 \text{ g mol}^{-1}$. Os compostos desse grupo são geralmente peptídeos, tais como: β 2-microglobulina e a leptina, e são apenas removíveis por membranas de porosidade grande durante o processo de diálise;
- Moléculas ligadas às proteínas, tais como: indoxil sulfato (IS) e *p*-cresil sulfato (PCS) que apesar de apresentarem baixa massa molar, são de difícil remoção por diálise devido à interação com as proteínas plasmáticas.

Nos últimos anos, estudos têm investigado a interação das toxinas urêmicas com as proteínas devido à sua alta toxicidade (POVEDA et al., 2014; GRYP et al., 2017; LIU, TOMINO; LU, 2018). Dentre estas toxinas avaliadas, podemos citar o PCS, que pode exercer vários efeitos nocivos no organismo. Esse composto é um produto da sulfatação do *p*-cresol (PC), proveniente da fermentação dos aminoácidos aromáticos tirosina e fenilalanina pela microbiota bacteriana no intestino grosso (WATANABE et al., 2012). Outra toxina urêmica proveniente do metabolismo de proteínas ingeridas na dieta é o indoxil sulfato (IS) sendo um derivado sulfatado do aminoácido triptofano (WATANABE et al., 2012) (FIGURA 7).

FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO DO METABOLISMO DAS TOXINAS URÊMICAS (PCS E IS) NO SISTEMA BIOLÓGICO.



FONTE: Adaptado de MEIJERS; EVENEPOEL, 2011.

Um dos primeiros estudos realizado *in vitro* demonstrou que o PCS causa o aumento do estresse oxidativo em leucócitos, o que sugere que este composto pode contribuir para a propensão do dano vascular em pacientes com DRC (SCHEPERS et al., 2007). Além disso, dados mostraram que o PCS estimula a liberação de micropartículas endoteliais, um marcador de dano endotelial (MEIJERS et al., 2009), induz estresse oxidativo tanto nas células endoteliais da veia umbilical humana, quanto nas células musculares lisas vasculares humanas (GROSS et al., 2015) e tem efeitos pró-apoptóticos e pró-inflamatórios sobre as células epiteliais tubulares proximais humanas, os quais podem em conjunto com outros fatores levar ao estresse oxidativo, promovendo a progressão da DRC (POVEDA et al., 2014). De acordo com Han e colaboradores (2015), o PCS também induz a atividade da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH) e a produção de espécies reativas de oxigênio em cardiomiócitos, facilitando a apoptose cardíaca resultando em disfunção diastólica em camundongos nefrectomizados.

Comumente, a concentração de PCS no sangue de indivíduos saudáveis é cerca de 6 μM , porém em pacientes em estágio final de DRC essa concentração aumenta para valores superiores a 300 μM . Esse aumento na concentração pode ser associado a interação do PCS com as proteínas plasmáticas, o que resulta na eliminação de apenas cerca de 29% do PCS via hemodiálise (BERGÉ-LEFRANC et

al., 2010). O acúmulo dessa toxina nesses pacientes tem sido associado com o surgimento de lesões vasculares, mortalidade e ativação de leucócitos na produção de radicais livres (GRYP et al., 2017).

Em relação ao IS, estudos clínicos demonstraram que há um aumento gradual na concentração sérica dessa toxina em pacientes portadores da DRC ao longo dos estágios da doença, sendo está diretamente associada com a calcificação de aorta e rigidez vascular (BARRETO et al., 2009). Segundo Yang e colaboradores (2012) foi observado em células endoteliais humanas tratadas com IS que a produção de óxido nítrico (NO) e óxido nítrico sintase endotelial fosforilado (eNOS) diminuíram, enquanto a produção de MCP-1 aumentou significativamente. Além disso, as altas concentrações de IS induziram o estresse oxidativo na aorta e nos rins em ratos do tipo Sprague-Dawley com insuficiência renal (KOIZUMI et al., 2014).

Estudos demonstram ainda que o mecanismo pelo qual o IS gera este estresse envolve seu transporte para dentro da célula através dos transportadores OATs (OAT1 e OAT3), na qual a enzima NADPH oxidase ativa células endoteliais, tubular renal e células mesangiais glomerulares (DEVINE et al., 2014; KOIZUMI et al., 2014).

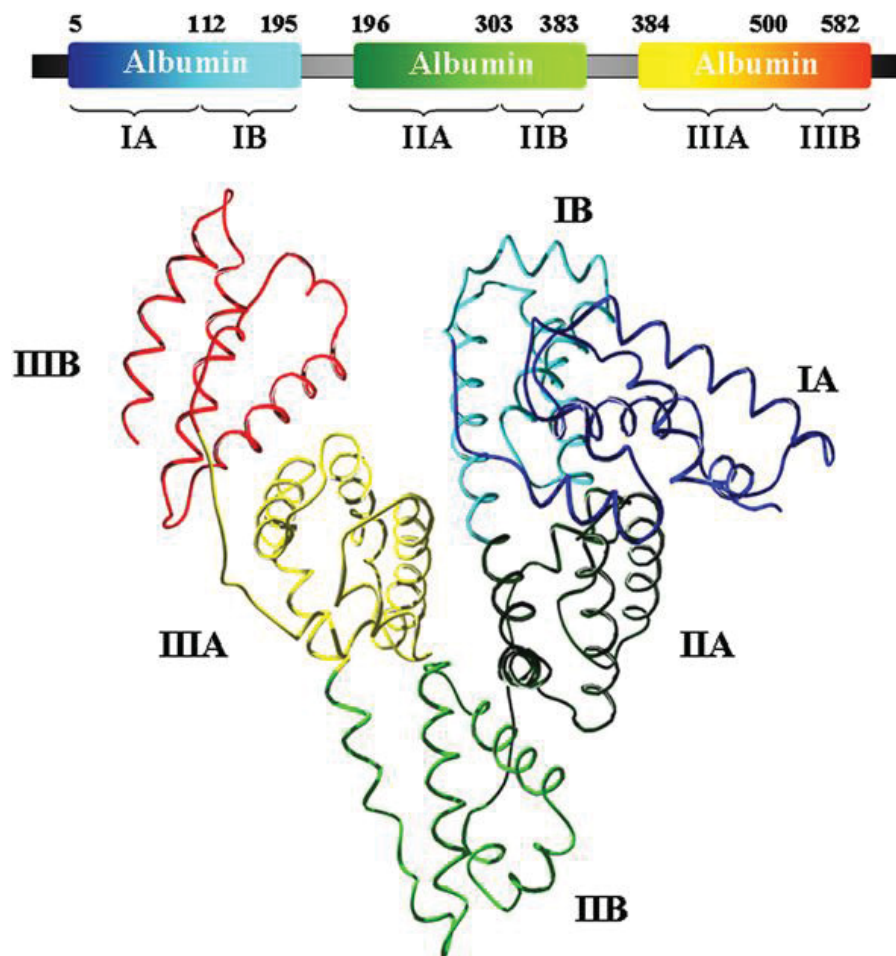
Em indivíduos saudáveis a taxa de excreção média do IS varia de 50-70 mg/dia (BARRETO et al., 2014). Entretanto, assim como acontece com o PCS, em pessoas no estado de uremia há o aumento dessa toxina no organismo. Nesses pacientes, cerca de 90% do IS encontra-se ligado a proteínas, principalmente a albumina sérica humana (HSA) (LEONG; SIRICH, 2016). Tal interação prejudica a remoção do IS por hemodiálise, uma vez que impede a sua passagem pelas membranas de diálise (LEONG; SIRICH, 2016).

Dentre as proteínas presentes no plasma sanguíneo, encontra-se a albumina sérica humana (HSA) que é a proteína mais abundante e desempenha uma ampla variedade de funções no meio biológico, contribuindo com 80% da pressão osmótica sanguínea e sendo essencialmente responsável pela manutenção do pH do sangue (KRAGH-HANSEN, 1981). Além disso, atua como uma proteína de transporte e de armazenamento temporário para numerosos compostos endógenos e exógenos (KRAGH-HANSEN; CHUANG; OTAGIRI, 2002). Uma extensa revisão sobre os aspectos genéticos, bioquímicos, biomédicos e biotecnológicos dessa proteína foi realizada por Fanali e colaboradores (2012).

A estrutura primária da HSA é constituída basicamente por uma única cadeia polimérica que contém 585 resíduos de aminoácidos totalizando uma massa molecular aproximada de 66 kDa. Essa cadeia polimérica pode ser dividida em três grandes domínios (I, II e III) que são divididos em dois conjuntos de subdomínios (A e B) (FIGURA 8, p. 36). Além disso, a estrutura da HSA também pode ser dividida em seis sítios de ligação, baseados na afinidade de seus ligantes, como pode ser observado a seguir (KRAGH-HANSEN; CHUANG; OTAGIRI, 2002; FASANO et al., 2005):

- sítio I (localizado no subdomínio IIA, tem preferência por ânions heterocíclicos pequenos);
- sítio II (localizado no subdomínio IIIA, tem preferência por ácidos carboxílicos aromáticos);
- sítios III e IV (afinidade por ácidos graxos de cadeia longa);
- sítio V (localizado no subdomínio IA, região onde está o aminoácido Cys34, tem preferência por íons metálicos como Au, Ag, Hg e Cd);
- sítio VI (também chamado de N-terminal), composto pela sequência dos três aminoácidos (Asp-Ala-His), está localizado no início da cadeia polimérica e possui afinidade por íons metálicos como o Cu e Ni.

FIGURA 8. ESTRUTURA DA HSA.



FONTE: Adaptado de FANALI et al., 2012.

LEGENDA: Representação dos três domínios da HSA e os subdomínios A e B (domínio IA, em azul; domínio IB, em ciano; domínio IIA em verde escuro; domínio IIB em verde claro; domínio IIIA em amarelo; domínio IIIB em vermelho).

Por apresentar diversos sítios ativos, a interação da HSA com as toxinas urêmicas tem sido alvo de estudos que visam entender o papel dessa proteína no transporte desses compostos. De acordo com Bergé-Lefranc e colaboradores, (2010) foi observado que as toxinas PC e PCS se ligam à HSA com afinidade moderada a 25 °C e fraca à temperatura fisiológica de 37 °C, sendo que os locais de ligação das duas moléculas são idênticos ou muito próximos. Em outro trabalho realizado por Watanabe et al. (2012) foi observado que as toxinas PCS e IS têm maior afinidade pelo sítio de ligação II da HSA e que ambas as moléculas competem pelo mesmo sítio. Dessa forma, há uma preocupação no que se refere à

compreensão do fenômeno de interação dessas toxinas com às proteínas, em especial com a HSA. Essas interações podem ter um impacto direto sobre a eliminação desses compostos.

Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar os mecanismos de interação entre a HSA e os compostos PCS e IS. Para o cumprimento dos objetivos do projeto, foram utilizados, principalmente, experimentos de RMN STD e ITC visando entender o papel dessa proteína na eliminação dessas substâncias do organismo de pacientes acometidos com a doença renal crônica.

2 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo geral

Caracterizar e elucidar os tipos de interações intermoleculares entre as toxinas urêmicas (PCS e IS) e a HSA.

2.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar o mapeamento dos epítomos das toxinas PCS e IS através dos experimentos de RMN STD;
- ✓ Determinar as constantes de dissociação (K_d) das toxinas PCS e IS na presença da HSA;
- ✓ Avaliar o efeito da temperatura e do aumento da força iônica nas constantes de dissociação (K_d) das toxinas PCS e IS na presença da HSA;
- ✓ Avaliar os potenciais sítios de ligação de cada toxina através de experimentos RMN STD utilizando compostos inibidores específicos de sítios de ligação da HSA, como o diazepam (sítio II);
- ✓ Determinar as constantes de associação (K_a) e parâmetros termodinâmicos (entalpia, entropia e energia livre de Gibbs) de cada toxina (PCS e IS) na presença da HSA utilizando a técnica de calorimetria por titulação isotérmica (ITC), visando corroborar com os dados obtidos por RMN.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 INFORMAÇÕES GERAIS

Foram utilizados os seguintes reagentes e solventes: albumina de soro humano 20% (Alburex[®]), albumina de soro humano ≥99% (Sigma-Aldrich[®]), indoxil sulfato (Sigma-Aldrich[®]), *p*-cresol (Sigma-Aldrich[®]), ácido clorosulfônico (Vetec[®]), hidróxido de potássio (Neon[®]), cloreto de sódio (Neon[®]), fosfato de sódio bibásico (Merk[®]), fosfato de sódio monobásico (Merck[®]), etanol (Emsure[®]), clorofórmio (Tedia[®]), metanol grau HPLC (Tedia[®]) piridina (Vetec[®]) e água deuterada 99,9% (CIL[®]).

As análises por cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de alumínio para HPTLC ALUGRAM[®] RP-18 W, com indicador UV254, recortadas em dimensões de 1,5 por 3 cm. As eluições foram feitas empregando solventes orgânicos puros ou combinados, e as revelações das placas foram realizadas em uma câmara com luz UV (254 nm) e iodo sublimado.

A análise de espectrometria de massas (EM) foi realizada em um espectrômetro LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific) pertencente ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), com analisador de massas do tipo *ion trap* linear, equipado com uma fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) programada para operar no modo positivo e negativo de aquisição. As informações foram registradas pelo modo de aquisição contínua, disponível no X-calibur. A amostra foi diluída a 10 ppm em metanol grau HPLC e injetadas diretamente no espectrômetro de massas. A faixa monitorada foi de *m/z* 50-800 Da.

Os espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos usando o espectrofotômetro JASCO J-815 equipado com uma unidade de controle de temperatura.

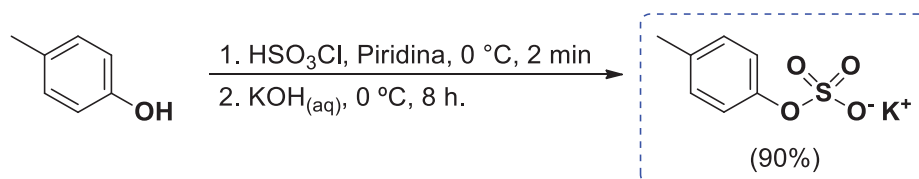
Os espectros de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais (RMN 1D/2D) foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance III-600 operando a 14,1 Tesla (observando os núcleos de ¹H e ¹³C a 600 MHz e 150 MHz, respectivamente) equipado com uma sonda 5 mm trinuclear TXI com detecção inversa e gradiente no eixo z.

As curvas de calorimetria de titulação isotérmica foram obtidas em um calorímetro modelo ITC₂₀₀, da MicroCal (Northampton, Estados Unidos).

3.2 PURIFICAÇÃO DA ALBUMINA HUMANA SÉRICA (HSA)

Em uma membrana de diálise de celulose Spectra/Por[®] com *cut-off* de 8 kDa, a HSA (1 mL) foi submetida a uma diálise fechada por 96 h utilizando uma solução aquosa de NaCl (2 mol L⁻¹). A cada 24 h a solução salina foi trocada, sendo que na última etapa foi utilizada apenas água destilada para a remoção do NaCl. Em seguida, a HSA foi congelada, liofilizada e posteriormente armazenada a -28 °C. A pureza da HSA foi avaliada por experimentos RMN de ¹H.

3.3 SÍNTESE DO *P*-CRESIL SULFATO (PCS)



A síntese do PCS foi adaptada da metodologia reportada por Feigenbaum; Neuberg (1941). Em um balão de 25,0 mL, equipado com agitação magnética em banho de gelo, foi adicionado *p*-cresol (PC) (1,0 g; 9,2 mmol) dissolvido em piridina (4,0 mL). Na sequência, foi adicionado gota a gota ácido clorosulfônico (0,9 mL; 13,9 mmol) e posteriormente, uma solução de hidróxido de potássio (4,0 mol L⁻¹) foi adicionada até a mistura reacional atingir pH 12. A reação foi mantida sob agitação, de 0 °C a temperatura ambiente, por 8 horas e o produto monitorado por cromatografia de camada delgada (CCD) eluída com metanol:cloroformio (9:1).

Então, em um funil de separação, a mistura foi lavada com éter (2 × 10 mL) e a fase aquosa foi evaporada sob pressão reduzida em um rotaevaporador. O sólido laranja obtido a partir da fase aquosa foi purificado por uma etapa de cristalização em etanol a quente (5 × 10,0 mL). As porções alcoólicas foram combinadas e o solvente removido sob pressão reduzida sem aquecimento. O

produto foi obtido como um sólido laranja com rendimento de 90% e a estrutura confirmada por RMN e espectrometria de massas.

3.4 PREPARO DA SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO DE SÓDIO (PBS)

A solução tampão fosfato de sódio pH 7,2 foi preparada pela adição de fosfato de sódio dibásico (146,2 mg), fosfato de sódio monobásico (26,2 mg) e cloreto de sódio (2,6 mg) em D₂O (5,0 mL) a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi sonicada por 3 min até a completa dissolução dos sais.

3.5 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR (DC)

Os espectros foram obtidos usando cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm. O nitrogênio foi utilizado como gás de purga em um fluxo de 10 L min⁻¹. A concentração de HSA utilizada nos experimentos foi de 0,02 mg mL⁻¹ em água ultrapura, contendo 50 mM de PBS, pH 7,2, 50 mM de NaCl, 25 °C.

A estabilidade térmica da HSA foi avaliada fixando o comprimento de onda em 209 nm e elevando-se a temperatura de 25 a 100 °C com uma taxa de aquecimento de 1 °C por minuto. Logo após o sistema foi resfriado de 100 a 25 °C.

A elipticidade residual molar média ($[\theta]$) foi calculada utilizando uma massa molecular de 66,437 kDa e um número de resíduos de aminoácidos igual a 585 usando a relação da Equação 10.

$$[\theta] = \frac{(\theta \times 100 \times M)}{(C \times l \times n)} \quad \text{EQUAÇÃO 10}$$

Onde θ é o grau de elipticidade (graus), l é o comprimento ótico (cm), C é a concentração (mg mL⁻¹), M é a massa molecular (kDa) e n é o número de resíduos de aminoácidos na proteína. A $[\theta]$ é dada em graus cm² dmol⁻¹ (CORRÊA; RAMOS, 2009).

3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES DE RMN

Todas as amostras foram preparadas em tubos de RMN de 5 mm com volume final de 600 μ L de D₂O (99,9 %) e para os experimentos de RMN STD foram adicionados 50 mM de PBS (pH 7,2) e 50 mM de NaCl mantendo-se o volume final igual a 600 μ L.

A avaliação dos parâmetros do experimento de RMN STD (frequência de *offset* do espectro *on resonance*) e a duração da trava de spin (sequência de pulsos que permite manter a magnetização no plano transversal por certo tempo) foi realizada utilizando-se uma amostra de IS e HSA com razão ligante/proteína igual a 50/1. Essa mesma relação foi utilizada para os experimentos de mapeamento do epítipo de cada ligante.

Enquanto para os experimentos de titulação por RMN STD, a concentração do ligante variou de 0,8 a 4,0 mM, com relação a razão entre ligante e proteína, os experimentos foram realizados variando-se o excesso de ligante (L) em relação a proteína (P) de 20 a 100 vezes, como pode-se observar na TABELA 1.

TABELA 1. CONDIÇÕES GERAIS UTILIZADAS PARA O EXPERIMENTO DE TITULAÇÃO POR RMN STD

| Excesso de ligante [L]/ [P] | [P] (μ M) | [L] (mM) |
|--------------------------------|-------------------|-------------|
| 20 | 40 | 0,8 |
| 30 | 40 | 1,2 |
| 40 | 40 | 1,6 |
| 50 | 40 | 2,0 |
| 80 | 40 | 3,2 |
| 100 | 40 | 4,0 |

3.7 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ¹H

Antes da aquisição dos experimentos de RMN de ¹H e STD, o *shimming* foi otimizado e o ângulo de 90° foi calibrado automaticamente usando o comando “*pulsecal*”. Os espectros de RMN de ¹H foram adquiridos com as sequências de pulso *zgesgp* ou *cpmgpr1d* que pré-saturam o sinal residual da água, cada ciclo foi

obtido com tempo de espera antes de cada aquisição (d1) igual a 2 s sendo repetidos até acumular 32 transientes e janela espectral igual a 12019,23 Hz. Os deslocamentos químicos foram calibrados em relação ao sinal do 2,2,3,3-D₄-trimetilsililpropionato de sódio tetradeuterado – TMSP-*d*₄ (0,0 ppm).

3.8 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN STD

A aquisição dos espectros de RMN STD foi realizada utilizando a sequência de pulsos com supressão de água, presente na biblioteca da Bruker, *stdiffesgp.3*.

Inicialmente, foi realizada a otimização de dois parâmetros presentes na sequência de pulso do experimento STD que devem ser avaliados para cada tipo de proteína específica. O primeiro deles é a frequência de *offset* do espectro *on-resonance*, dessa forma avaliou-se os seguintes valores de *offset*: 600, 450, 300, -300 e -600 Hz. O segundo parâmetro se refere a trava de spin (d29), sendo assim foram avaliados os tempos de 20, 30 e 40 ms. A irradiação fora da faixa de frequência dos sinais da proteína foi realizada em 24000 Hz (fora da janela espectral) onde nenhum sinal da proteína ou do ligante estão presentes. A saturação seletiva dos hidrogênios da proteína foi realizada por um trem de pulsos gaussianos com duração de 50 ms cada, separados por um intervalo de 1 ms. O tempo de espera entre cada aquisição (d1) foi de 5 s, número de transientes (NS) igual a 256 e janela espectral de 9000 Hz (15 ppm).

As condições de aquisição dos espectros de RMN STD para o mapeamento do epítipo dos ligantes e para os experimentos de titulação foram idênticas às anteriormente descritas. A região espectral de excitação do espectro *on-resonance* foi fixada em 0,75 ppm e a trava de spin igual a 40 ms. Além disso, nos experimentos de titulação o tempo de saturação (d20) foi variado em 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 4,0 s para cada razão [L]/[P], totalizando 48 experimentos.

A avaliação do efeito da temperatura e do aumento da força iônica nas constantes de dissociação (*K_d*) de cada toxina (PCS e IS) com a HSA foi realizada utilizando experimentos de titulação por RMN STD, elevando-se a temperatura para 37 °C e a quantidade de cloreto de sódio para 200 mM, respectivamente.

A avaliação do potencial sítio de ligação do PCS com a HSA foi realizada utilizando o experimento de competição por RMN STD, no qual o composto PCS foi titulado em uma solução contendo 2 mM de diazepam e 40 µM de HSA (50:1).

3.9 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES DE ITC

Uma solução de 0,1 mM de HSA foi preparada em solução tampão de PBS (50 mM; pH 7,2) contendo 50 mM de NaCl. As soluções de PCS (10 mM) e IS (30 mM) foram preparadas em solução tampão de PBS (50 mM; pH 7,2) contendo 50 mM de NaCl. Ambas as soluções foram filtradas e degaseificadas por 10 minutos antes da realização das análises.

3.10 ANÁLISES DE ITC

A metodologia desenvolvida para as análises de ITC foi baseada no trabalho de Bergé-Lefranc et al. (2014). A célula de referência foi preenchida com 200 µL de água deionizada, enquanto a célula de reação foi preenchida com o mesmo volume de solução de proteína HSA. Foram injetadas sequencialmente 30 alíquotas de 1,3 µL das soluções de PCS ou IS.

Cada injeção teve uma duração de 1,5 s e um intervalo de 120 s entre as sucessivas injeções. A temperatura da solução da célula de titulação foi mantida a 37 °C e a solução foi agitada a 1000 rpm em todos os experimentos para assegurar a homogeneização do sistema durante as titulações. As medidas de ITC foram conduzidas em duplicata e os resultados foram reportados como a média das titulações. SEnod a primeira injeção relaizad com menor volume de toxian

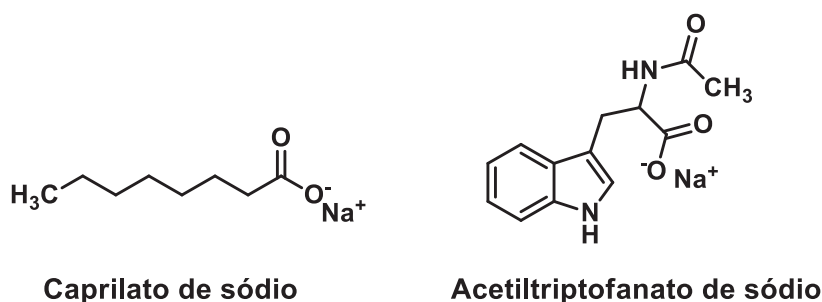
O calor de diluição da titulação do branco da proteína com a solução tampão foi subtraída dos dados brutos. O software Microcal ORIGIN 7.0® do ITC foi utilizado para o tratamento dos dados coletados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 PURIFICAÇÃO DA ALBUMINA HUMANA SÉRICA (HSA)

A etapa de purificação da HSA foi realizada visando a eliminação dos compostos acetiltryptofanato de sódio e caprilato de sódio contaminantes presentes na composição do medicamento Alburex® (FIGURA 9). Através da análise do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 10b) é possível determinar a presença de vários sinais relativos a HSA (sinais alargados devido a rápida relaxação transversal da macromolécula) bem como sinais relativos aos compostos de baixa massa molar presentes tanto na região de hidrogênios aromáticos quanto na região alifática.

FIGURA 9. ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS PRESENTES NO MEDICAMENTO ALBUREX®.



A presença desses compostos torna-se ainda mais evidente quando utilizada a sequência de pulsos *cpmgpr1d* na aquisição do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 10a). Basicamente, a sequência de pulsos *cpmgpr1d* se caracteriza pela aplicação de um pulso inicial de RF de 90° , seguido de um pulso de RF de 180° e a aquisição de uma sequência de ecos de spin $[90^\circ-(\tau-180^\circ-\tau)_n\text{-FID}]$, onde τ (d20) representa os intervalos entre os pulsos de 180° e n (14) o número de vezes em que a sequência é repetida. Portanto, ao selecionar o d20 apropriado pode-se eliminar os sinais da proteína, devido à perda de coerência de fase oriunda do curto tempo de relaxação transversal inerente às macromoléculas.

Sendo assim, avaliando-se os espectros de RMN ^1H da HSA após o procedimento de diálise, nenhum sinal referente aos contaminantes foi observado (FIGURAS 11a e 11b).

FIGURA 10. ESPECTROS DE RMN DE ^1H DA **HSA** ANTES DA PURIFICAÇÃO. (A) *cpmgpr1d* COM $\tau = 200$ ms e (B) *zgesgp* (600 MHz, 25 °C, D_2O).

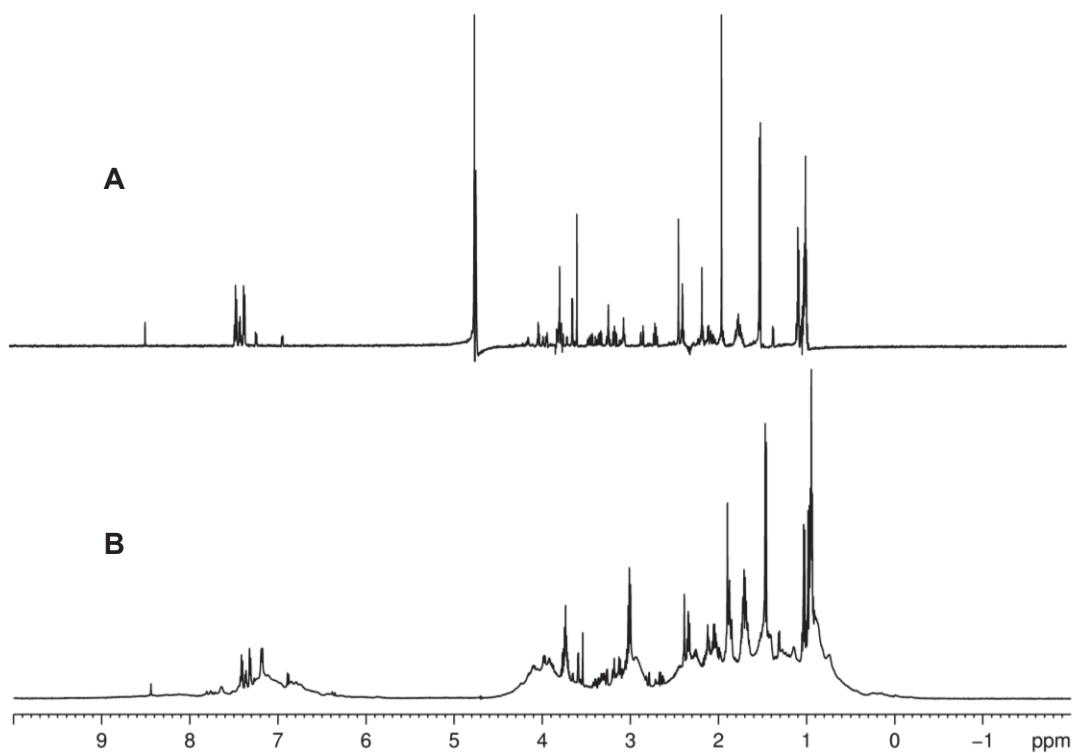
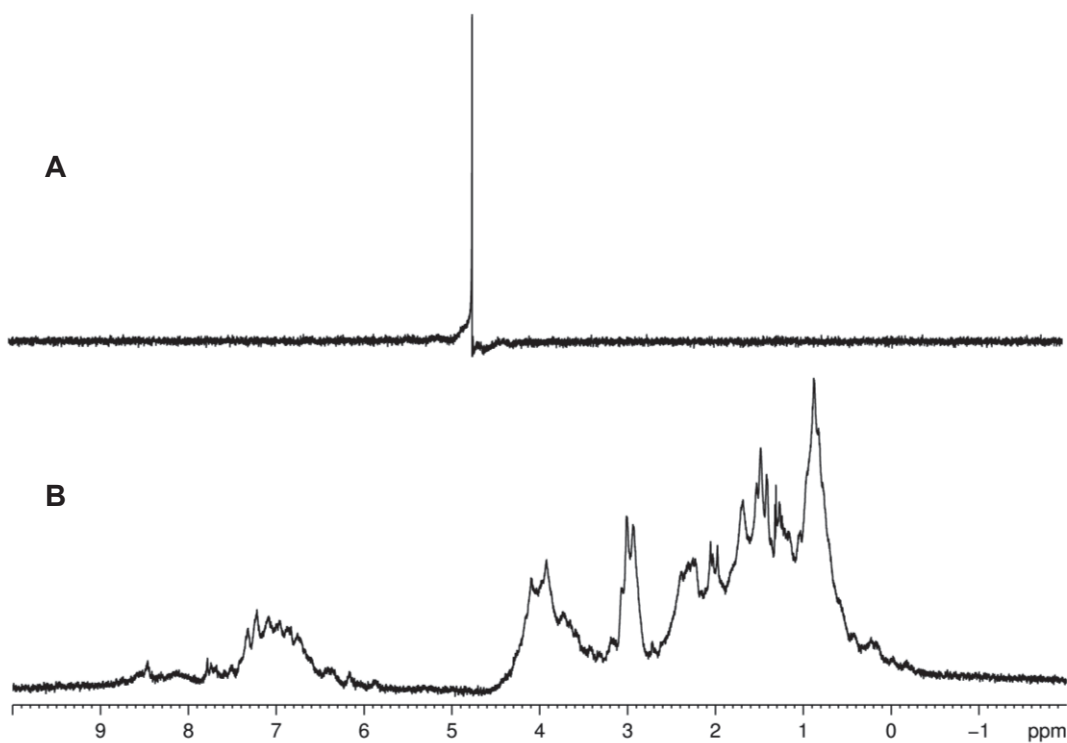
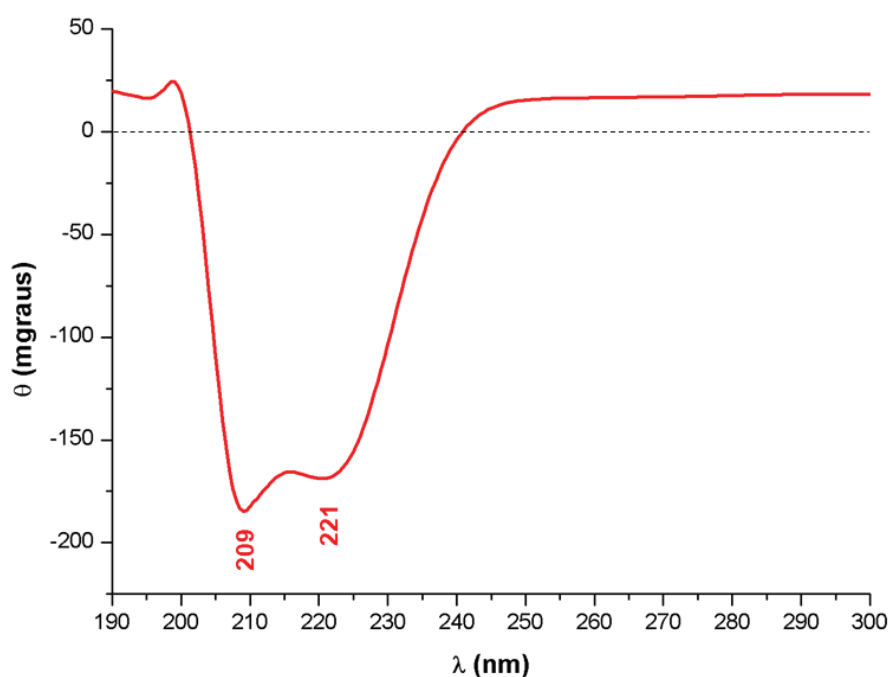


FIGURA 11. ESPECTROS DE RMN DE ^1H DA **HSA** DEPOIS DA PURIFICAÇÃO. (A) *cpmgpr1d* COM $\tau = 200$ ms e (B) *zgesgp* (600 MHz, 25 °C, D_2O).



Visando obter informações referentes a conformação da HSA purificada, foi adquirido o espectro de dicroísmo circular (DC). Com base nos resultados obtidos, pôde-se observar no espectro duas bandas negativas em 209 e 221 nm, características da estrutura α -hélice da HSA (GAO et al., 2004), indicando que o processo de purificação empregado não causou alterações na estrutura secundária da HSA (FIGURA 12).

FIGURA 12. ESPECTRO DE DC DA **HSA** purificada (pH 7,2, 50 mM DE PBS, 50 MM DE NaCl, 25 °C).

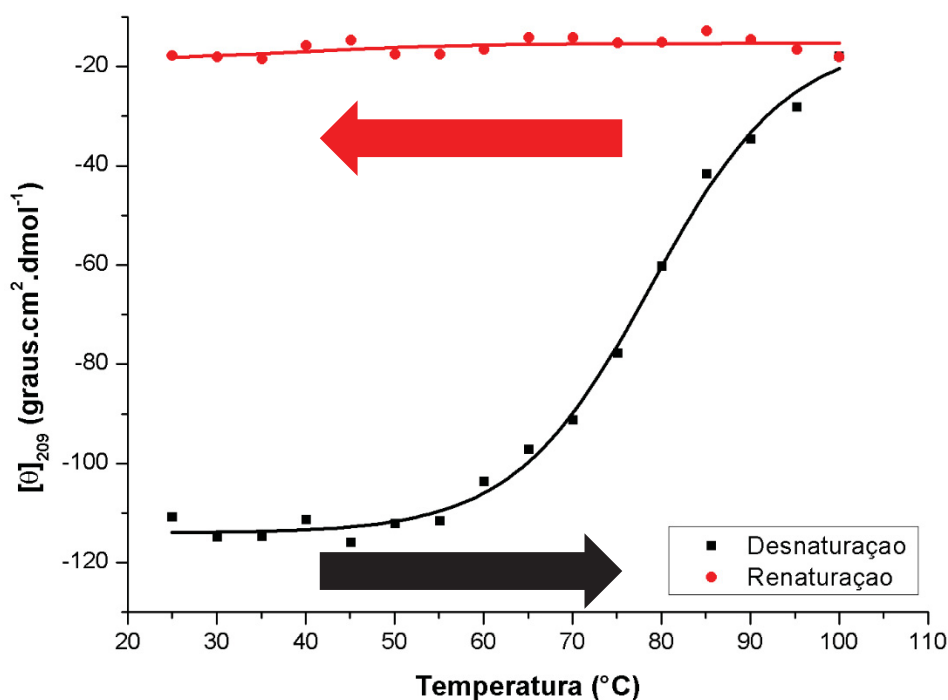


Além disso, a técnica de DC pode ser usada para estudar a estabilidade de uma proteína na presença de condições desnaturantes, por exemplo, temperatura e pH extremos. Conforme a temperatura aumenta, a estabilidade da proteína é afetada e, portanto, ocorre a perda de estrutura. Dessa forma, a transição pode ser facilmente determinada fixando o comprimento de onda onde a diferença de sinal entre a proteína enovelada e desenovelada é grande.

Ao avaliar o gráfico de DC do experimento de desnaturação térmica da HSA, foi observado que a HSA é estável até 55 °C e em temperaturas maiores ocorre a desnaturação da proteína acompanhada pela perda acentuada da elipticidade, sendo a temperatura crítica calculada igual a 78,8 °C (FIGURA 13). O valor da

elipticidade em 209 nm a 100 °C não é igual a zero indicando que o processo de desnaturação não é completo. Além disso, a diminuição da temperatura no experimento de renaturação não afeta os valores de elipticidade sugerindo que a perda da estrutura da proteína é um processo irreversível nessas condições. Segundo o trabalho de Lang e Cole (2015) empregando a técnica de calorimetria exploratória diferencial com uma taxa de aquecimento de 1 K por minuto, a HSA livre de ácidos graxos apresenta a temperatura de desnaturação de ~62 °C, porém na presença de ácidos graxos essa faixa é deslocada para ~75-80 °C, indicando que as moléculas de ácidos graxos não foram completamente removidas durante o processo de purificação. Entretanto, sob condições fisiológicas normais, há entre 0,1 a 2 moléculas de ácidos graxos ligadas à albumina (CURRY et al., 1998), possivelmente competindo com outros ligantes pelos sítios de ligação e conferindo à proteína uma estabilidade adicional. Dessa forma, diante dos sistemas em estudo optou-se por dar continuidade no trabalho utilizando essa HSA uma vez que assim a proteína estaria em uma situação mais próxima daquela que ocorre *in vivo*.

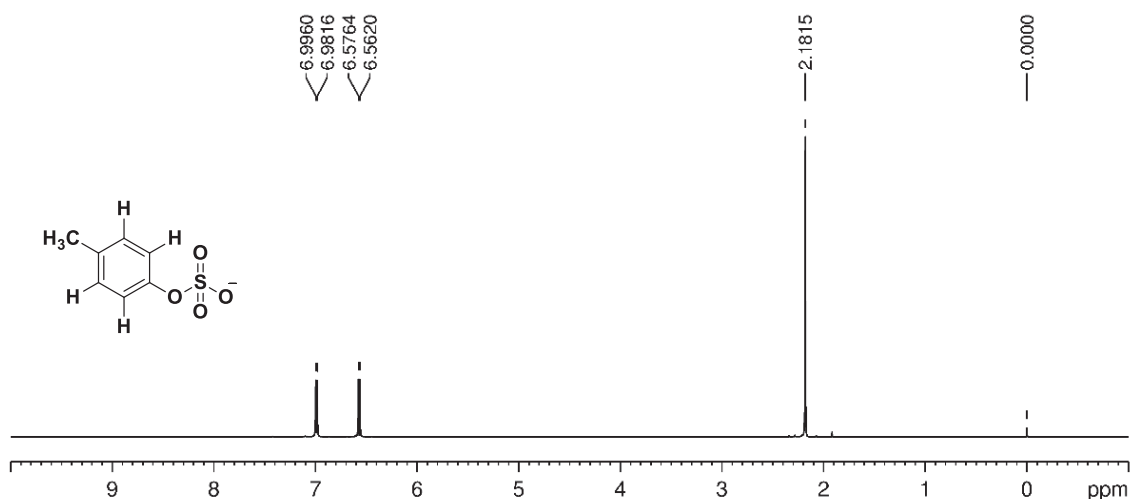
FIGURA 13. VALORES DE ELIPTICIDADE MOLAR RESIDUAL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA **HSA** purificada (50 mM DE PBS (pH 7,2), 50 mM DE NaCl).



4.2 SÍNTESE DO *P*-CRESIL SULFATO (PCS)

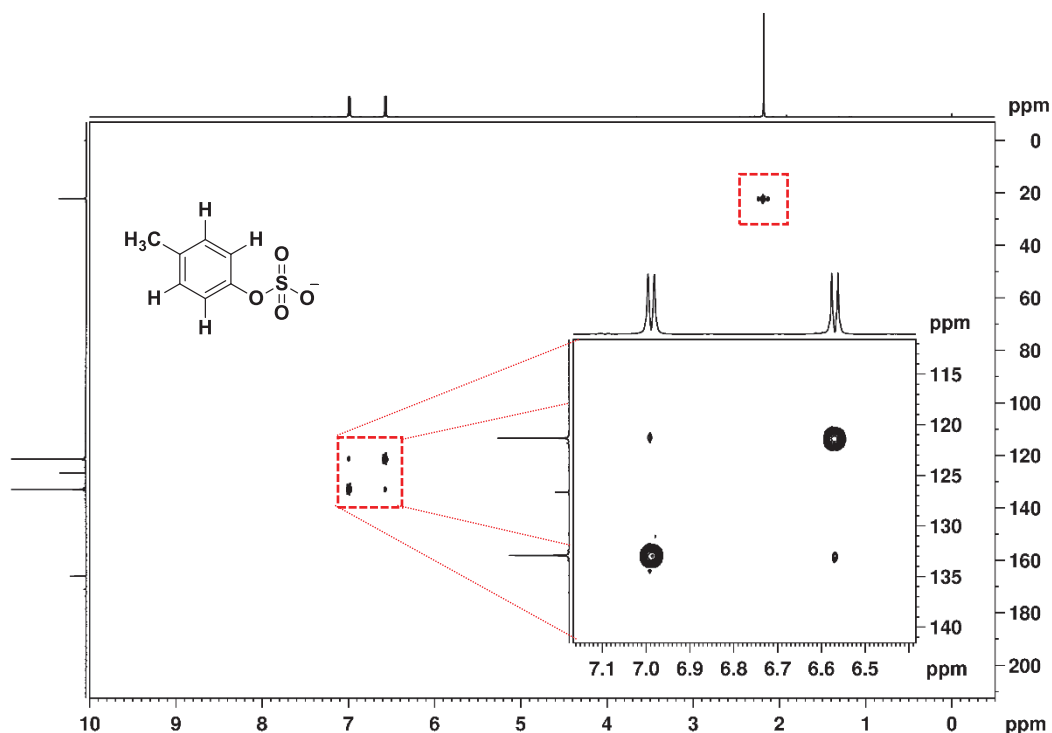
Um composto amorfo de coloração alaranjada com rendimento de 90% e pureza de acima de 98% foi obtido a partir da reação do *p*-cresol com ácido clorosulfônico. Analisando o espectro de RMN de ^1H , foi observada a presença de dois dupletos característicos de hidrogênios aromáticos de sistema *para*-substituído em δ 6,57 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz) e δ 6,99 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz). Este perfil é facilmente reconhecido pela presença de desdobramento de segunda ordem dos sinais (FIGURA 14).

FIGURA 14. ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO **PCS** (600 MHz, 25 °C, D_2O).



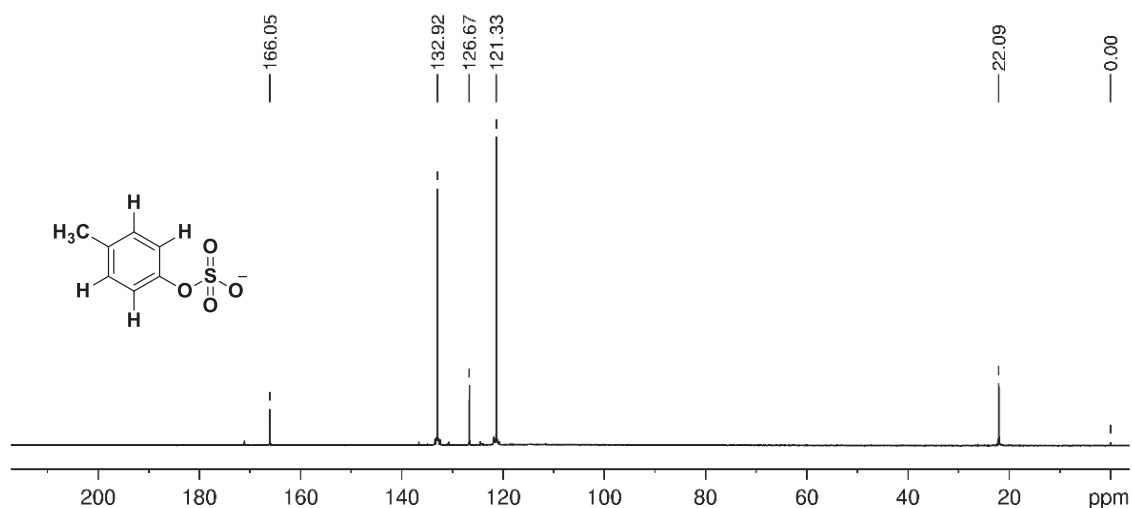
Pela análise do mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC foi observado que esses sinais correlacionam aos carbonos em δ 121,3 (C-2/C-6) e δ 132,9 (C-3/C-5), respectivamente (FIGURA 15). Verificou-se também, a presença de um simpleto na região de alifáticos em δ 2,18 (3H, s) o qual apresenta correlação com o carbono em δ 22,1 característico de um grupo metílico ligado a um anel aromático.

FIGURA 15. MAPA DE CORRELAÇÃO DIRETA ^1H - ^{13}C HSQC DO **PCS** (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz, 25 °C, D_2O).



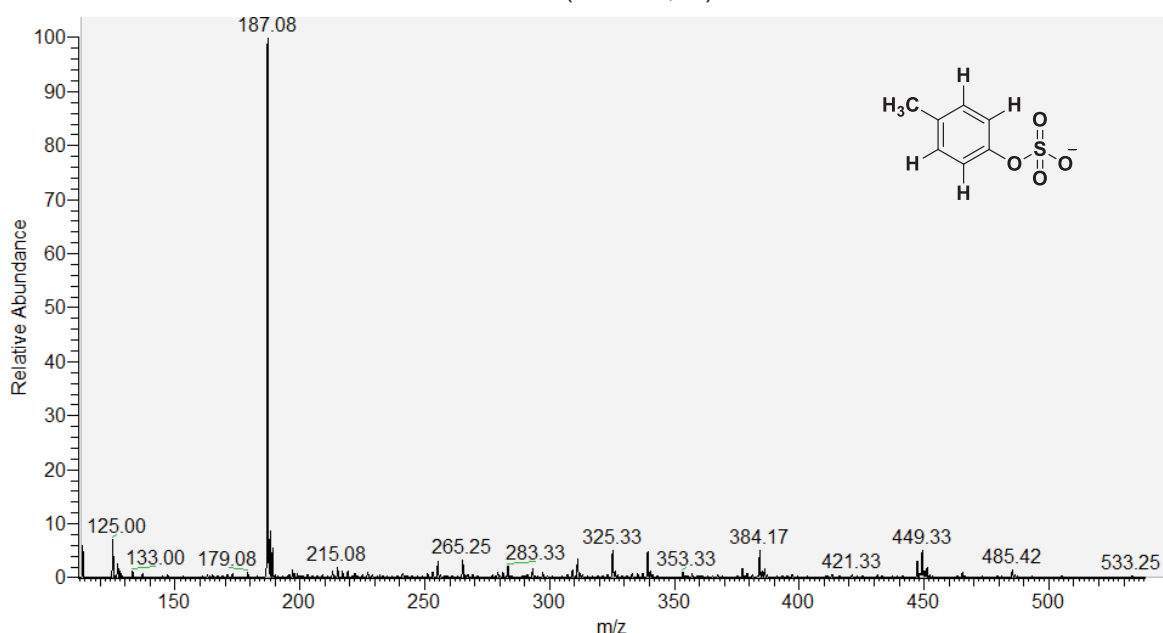
Pela análise do espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (FIGURA 16), observou-se a presença de 5 carbonos, sendo 4 aromáticos entre δ 166,0 e δ 121,3 e um alifático em δ 22,1, sendo o deslocamento químico em 166,0 ppm característico de um carbono aromático oxigenado.

FIGURA 16. ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ DO **PCS** (150 MHz, 25 °C, D_2O).



A presença do substituinte sulfato na molécula foi observada pela análise por espectrometria de massas (EM) (FIGURA 17), utilizando a técnica de ionização *eletrospray* operando no modo negativo de aquisição de dados (ESI⁻), que evidenciou uma molécula desprotonada [M-H]⁻ com m/z 187,08 Daltons compatível com a fórmula molecular C₇H₇SO₄ (calculado 187,19 Da) (FIGURA 17). Dessa forma, as informações contidas nas análises de RMN e EM, corroboraram para confirmar a síntese do composto *p*-cresil sulfato (PCS).

FIGURA 17. ESPECTRO DE MASSAS DO PCS (m/z 187,08).

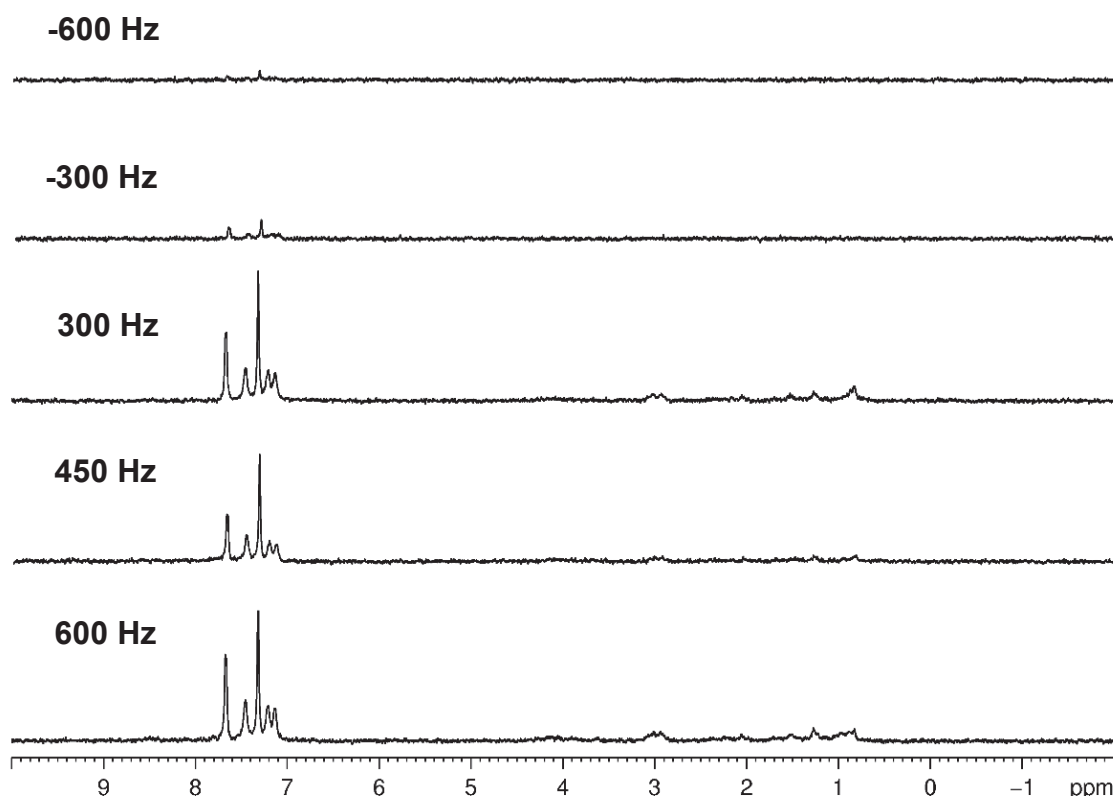


4.3 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO EXPERIMENTO DE RMN STD

Antes da aquisição dos espectros de RMN STD para o cálculo das constantes de dissociação ou para o mapeamento de epítomos, existe um conjunto de parâmetros experimentais que necessitam ser otimizados. O primeiro deles foi a frequência de *offset* do espectro *on-resonance*. Esse parâmetro deve ser escolhido criteriosamente, pois somente os sinais da proteína devem ser irradiados para que a saturação se propague via relaxação cruzada intramolecular entre hidrogênios da proteína e seja transferida para os compostos complexados por relaxação cruzada intermolecular na interface receptor-ligante. Dessa forma, foram avaliadas as seguintes frequências de *offset*: 600, 450, 300, -300 e -600 Hz.

Como pode-se observar nos espectros de RMN STD apresentados na FIGURA 18, a frequência de 450 Hz (0,75 ppm) foi a que apresentou os melhores resultados, sendo observados todos os sinais do composto IS na região espectral entre 7-8 ppm, ausência de sinais alargados referentes a HSA e sinais pouco intensos referentes a possíveis contaminantes na região entre 0,5-3,5 ppm.

FIGURA 18. ESPECTROS DE RMN STD DO **IS** VARIANDO A FREQUÊNCIA DE *OFFSET* NO ESPECTRO *ON-RESONANCE* (600 MHz, 25 °C, D₂O, pH 7,2).

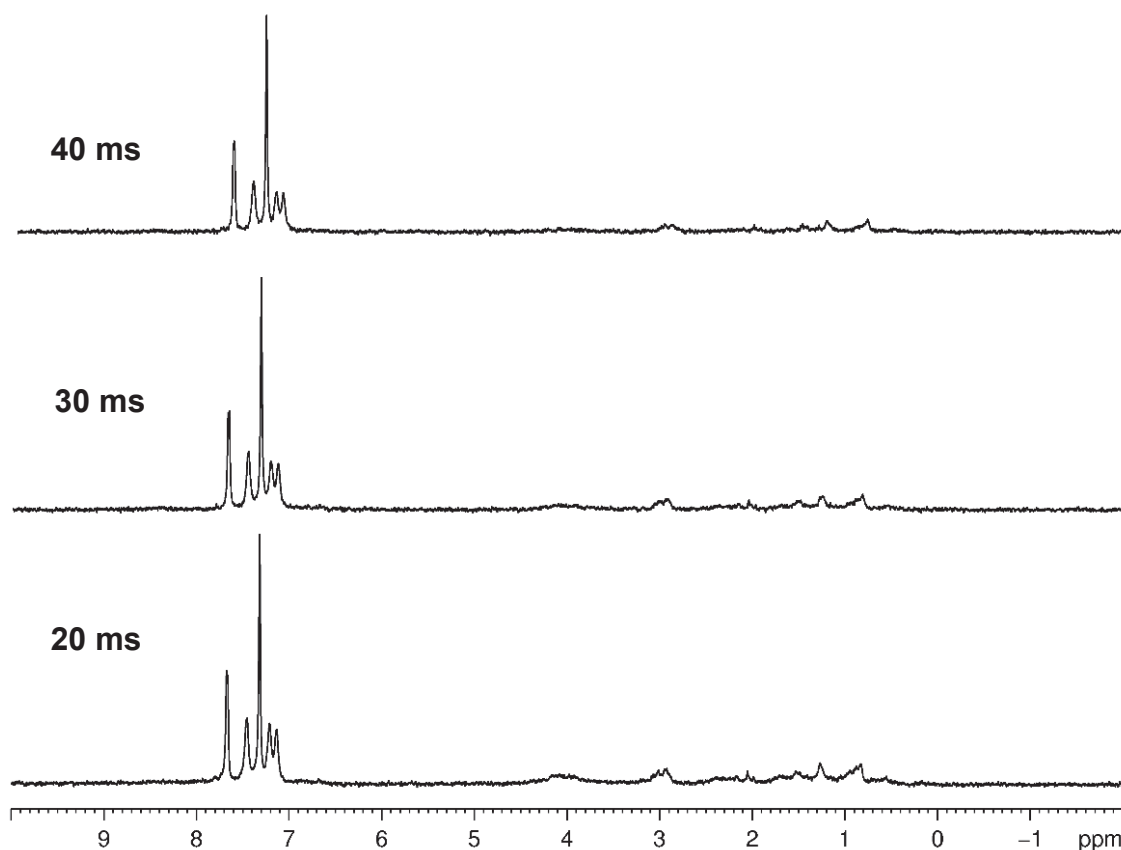


O segundo parâmetro otimizado se refere a trava de spin, chamada de filtro T1p, que elimina o sinal residual da proteína facilitando a análise. Neste sentido, foram avaliados os tempos de 20, 30 e 40 ms, sem perdas significativas de intensidade dos sinais do ligante, conforme apresentado na FIGURA 19.

A análise dos espectros de RMN de STD permitiu observar que o experimento referente ao tempo de 40 ms forneceu o melhor perfil espectral, com a maior atenuação dos sinais da proteína e possíveis contaminantes presentes na amostra, sem perdas significativas de intensidade dos sinais do composto IS (FIGURA 19). Dessa forma, a frequência de *offset* do espectro *on-resonance* em 450

Hz e a trava de spin em 40 ms foram fixadas para os demais experimentos de RMN STD.

FIGURA 19. ESPECTROS DE RMN STD DO **IS** VARIANDO A TRAVA DE SPIN (600 MHz, 25 °C, D₂O, pH 7,2).



4.4 MAPEAMENTO DO EPÍTOPO DO LIGANTE POR RMN STD

Com relação ao mapeamento dos epítomos dos ligantes é possível observamos que através dos espectros de RMN de ¹H há um alargamento dos sinais dos compostos na presença da proteína. Isso ocorre, pois, as moléculas de baixa massa molar passam a assumir características similares as macromoléculas, ou seja, passam a apresentar tempos de relaxação transversal curtos que implicam na perda de coerência de fase dos sinais e, portanto, resultando em sinais mais alargados (FIGURAS 20 e 21).

FIGURA 20. ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO **PCS** COM E SEM A PRESENÇA DA **HSA** (600 MHz, 25 °C, D_2O).

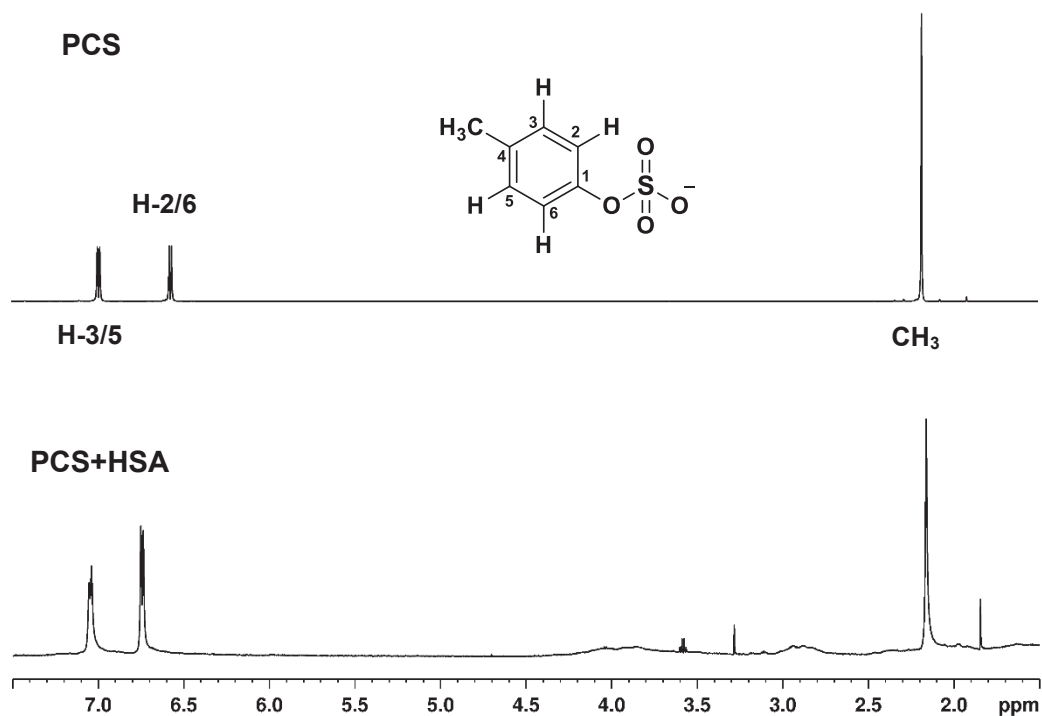
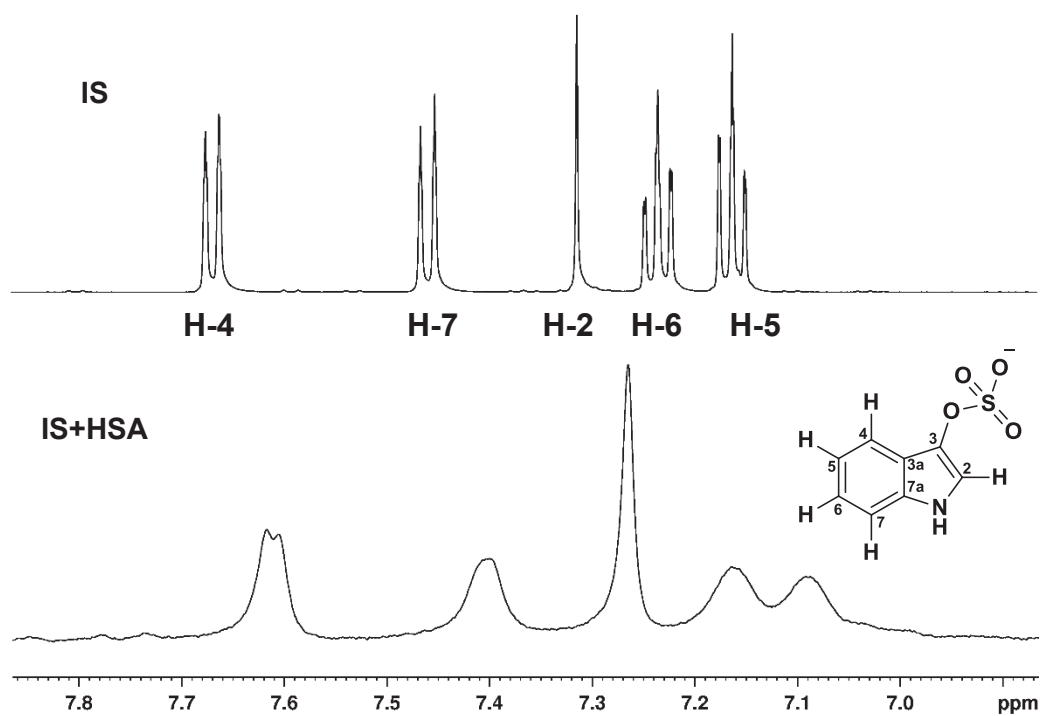
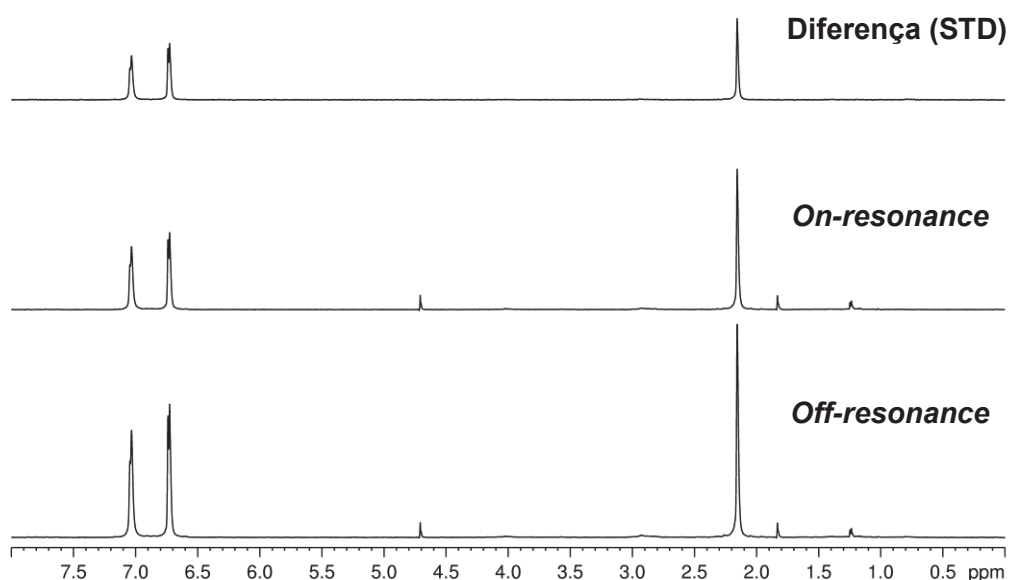


FIGURA 21. ESPECTROS DE RMN DE ^1H DO **IS** COM E SEM A PRESENÇA DA **HSA** (600 MHz, 25 °C, D_2O).



Com relação ao espectro de RMN STD, o processamento é feito como demonstrado na FIGURA 22, utilizando como exemplo o PCS na presença de 40 μ M de HSA (razão molar proteína-ligante igual a 1:100). É realizada a subtração dos sinais presentes no espectro saturado (*on-resonance*) daqueles sinais presentes no espectro de referência (*off-resonance*) resultando no espectro da diferença (STD).

FIGURA 22. EXEMPLIFICAÇÃO DA OBTENÇÃO DO ESPECTRO DE RMN STD DO **PCS** NA PRESENÇA DA **HSA** (600 MHz, 25 °C, D₂O, 50 mM PBS, 50 mM DE NaCl).



Uma vez que todos os espectros de RMN STD foram processados, existem duas abordagens para realizar o mapeamento do epítipo do ligante. A primeira delas é feita com base na amplificação da magnetização do sinal que é traduzida pelo fator de amplificação de STD (A_{STD}), assumindo que não depende do tempo de saturação escolhido (MAYER; MEYER, 2001). Portanto, o hidrogênio com o maior A_{STD} é igual a 100%, sendo os restantes normalizados em relação a este.

Porém, as diferentes taxas de relaxação longitudinal dos diferentes pacotes de spins podem produzir erros na definição do epítipo (MAYER; JAMES, 2004; YAN et al., 2003). Dessa forma, existe uma segunda abordagem proposta por Mayer e James (2004) que visa suplantar esses problemas, através da utilização do fator de

amplificação STD inicial (A_{STD0}), que pode ser calculado pelo ajuste matemático dos dados das curvas de A_{STD} experimentais, levando em conta a área do sinal observado no espectro de STD, as propriedades de relaxação de um determinado hidrogênio e o tempo de saturação utilizado no experimento. Nesse trabalho, o mapeamento do epítipo foi realizado utilizando o fator de amplificação STD inicial (A_{STD0})

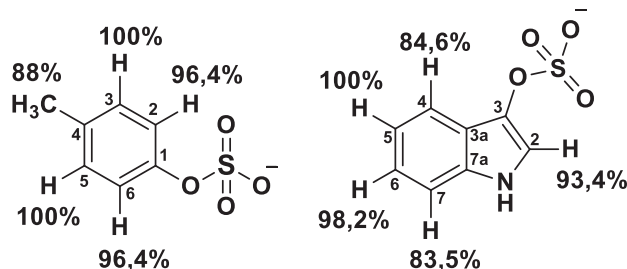
Entretanto, visando demonstrar a diferenças entre essas duas abordagens na TABELA 2 são apresentados os mapeamentos dos epítipos do PCS e IS levando-se em consideração diferentes tempos de saturação (0,5 a 4 s) e o fator de amplificação STD inicial (A_{STD0}) e pode-se observar que o epítipo dos ligantes podem ser diferentes em função do tempo de saturação escolhido. Por exemplo, quando utilizado um tempo de saturação de 4,0 s, foi observado que os sinais dos hidrogênios H-2/6 (100%) e H-2 do PCS e IS, respectivamente, foram os que apresentaram maiores fatores de amplificação no espectro de STD.

No entanto, quando foram utilizados os valores de A_{STD0} calculados através de ajustes matemáticos reportados por Angulo, Enríquez-Navas e Nieto, 2010 (FIGURA 23), foram observados que os hidrogênios H-3/5 (100%) do PCS e o H-5 (100%) do IS apresentaram maior proximidade com a proteína, indicando que o uso de tempos de saturação longos pode causar um decaimento do fator de amplificação observado devido aos processos de relaxação T_1 , subestimando a interação e proximidade dos ligantes com a proteína. Além disso, em ambas as toxinas o anel aromático parece ser fundamental na interação com a HSA.

TABELA 2. MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS RELATIVOS AOS VALORES DE A_{STD} PARA DIFERENTES TEMPOS DE SATURAÇÃO E PARA UM LIMITE DE TEMPO DE SATURAÇÃO QUE TENDE A ZERO (A_{STD0})

| | Epítipo do PCS | | | Epítipo do IS | | | | |
|-------------------------------------|----------------|-------|-----------------|---------------|------|------|-------|------|
| | H-2/6 | H-3/5 | CH ₃ | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-7 |
| t_{sat} = 0,5 s (%) | 95,3 | 100 | 89,1 | 84,0 | 92,3 | 91,6 | 100,0 | 75,7 |
| t_{sat} = 0,75 s (%) | 97,1 | 100 | 89,6 | 94,2 | 68,2 | 100 | 93,5 | 81,3 |
| t_{sat} = 1,0 s (%) | 95,8 | 100 | 85,2 | 99,2 | 94,1 | 97,8 | 100 | 88,2 |
| t_{sat} = 1,5 s (%) | 98,1 | 100 | 86,0 | 98,7 | 93,2 | 100 | 98,2 | 93,1 |
| t_{sat} = 2,0 s (%) | 99,5 | 100 | 86,3 | 100 | 95,1 | 94,3 | 94,1 | 95,5 |
| t_{sat} = 2,5 s (%) | 100 | 99,1 | 85,2 | 100 | 94,1 | 96,0 | 95,1 | 96,1 |
| t_{sat} = 4,0 s (%) | 100 | 98,8 | 83,8 | 100 | 94,8 | 92,1 | 94,2 | 95,1 |
| A_{STD0} (%) | 96,4 | 100 | 88 | 93,4 | 84,6 | 100 | 98,2 | 83,5 |

FIGURA 23. MAPEAMENTO DO EPÍTOPO DE LIGAÇÃO DO PCS E IS A PARTIR DOS EXPERIMENTOS DE RMN STD



4.5 ESTUDOS DE TITULAÇÃO POR RMN STD

4.5.1 Determinação das constantes de dissociação das toxinas urêmicas (PCS e IS) ligadas a albumina humana

Uma vez definidos os epítomos das toxinas utilizando o experimento de RMN STD, a próxima etapa foi a determinar a magnitude das interações das toxinas urêmicas (PCS e IS) com a albumina humana através do cálculo das constantes de dissociações (K_d).

Segundo Angulo, Enríquez-Navas; Nieto (2010), alguns parâmetros podem influenciar significativamente na determinação das constantes de dissociação (K_d) por RMN STD, tais como: a concentração da proteína, o tempo de saturação (t_{sat}) e a intensidade do sinal no espectro STD. Visando eliminar essas influências, esses autores propõem que o cálculo dessas constantes seja feito através da construção de uma isoterma de ligação (Langmuir) como função da concentração do ligante na amostra pelos valores dos fatores de amplificação STD inicial (A_{STD0}) (ANGULO, ENRÍQUEZ-NAVAS; NIETO, 2010).

Dessa forma, utilizando essa metodologia foi possível determinar as constantes de dissociação dos sistemas PCS ($K_d = 6,5$ mM) e IS ($K_d = 4,8$ mM) com a HSA a 25 °C; esses valores indicam que ambas as toxinas possuem uma afinidade moderada com a HSA nas condições estudadas (FIGURA 24 e 25, TABELA 3).

Na literatura é reportada a constante de afinidade obtida por calorimetria de titulação isotérmica (K_a) do PCS com a HSA sendo igual a 401 M⁻¹ ($K_d = 2,5$ mM, 25 °C) (BERGÉ-LEFRANC et al., 2010), enquanto para o IS com a HSA sendo igual a

FIGURA 25. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O $A_{STD0[L]}$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO **IS** (50 mM DE PBS, 50 mM DE NaCl, 25 °C).

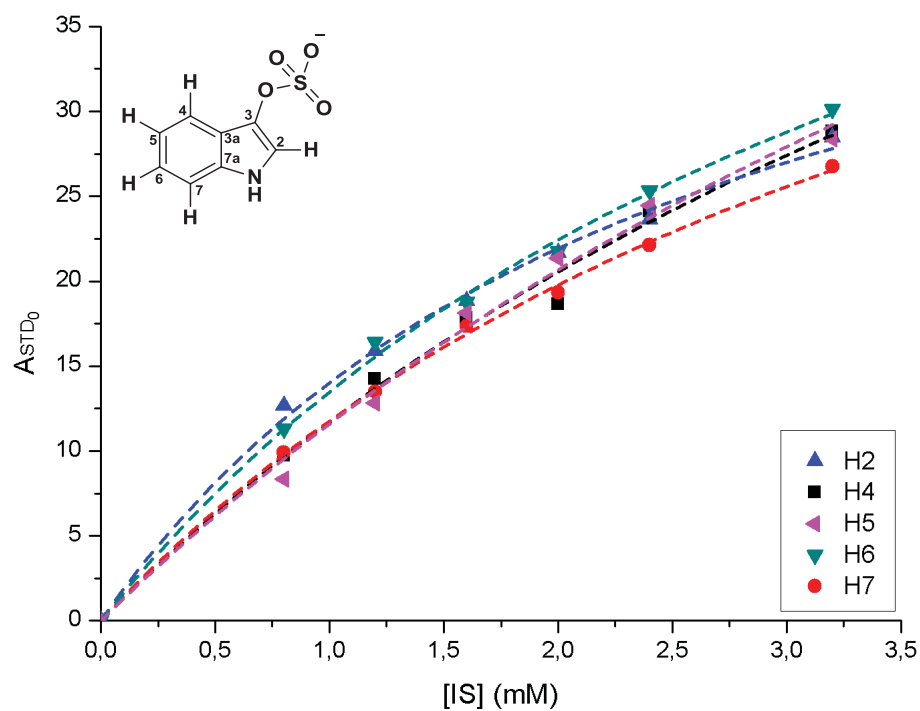


TABELA 3. CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO (K_d) CALCULADAS UTILIZANDO OS VALORES DE A_{STD0} PARA O **PCS** E **IS** (50 mM PBS, 50 mM DE NaCl, 25 °C)

| Sinais | K_d (mM) | |
|-----------------|------------|-----|
| | PCS | IS |
| H-2 | 6,0 | 2,6 |
| H-3 | 5,4 | - |
| H-4 | - | 6,1 |
| H-5 | 5,4 | 7,1 |
| H-6 | 6,0 | 3,9 |
| H-7 | - | 4,2 |
| CH ₃ | 8,1 | - |
| Média | 6,5 | 4,8 |

4.5.2 Avaliação da influência da temperatura e do aumento da força iônica nas constantes de dissociação (K_d) do PCS e IS ligados a HSA

Ao alterar a concentração de um sal, em uma solução, a propriedade modificada é a força iônica, que depende da concentração do eletrólito e da sua valência (DE VICENTE, 2004). Segundo Fennema et al. (2010), forças iônicas baixas neutralizam as cargas da superfície das proteínas. Este evento pode ter influências diferentes de acordo com a proteína, variando conforme as características da carga superficial da molécula.

A avaliação do efeito da temperatura no sistema foi realizada utilizando as temperaturas de 25 °C e 37 °C, enquanto para os ensaios da influência da força iônica foram utilizados 50 mM e 200 mM de NaCl.

Como pode ser observado na TABELA 4, o aumento da temperatura conduziu ao aumento da constante de dissociação do PCS ($K_d = 8,5$ mM), ou seja, diminui a interação dessa toxina com a HSA, enquanto o aumento da força iônica não alterou a constante de dissociação ($K_d = 6,8$ mM) (FIGURAS 26 e 27). Isso pode ser explicado pelo aumento da energia cinética do sistema em consequência da elevação da temperatura que por sua vez desloca o equilíbrio de ligação no sentido dos reagentes no estado livre. Em contrapartida, o aumento da força iônica pode não ter sido o suficiente para provocar o mesmo comportamento para essa toxina.

FIGURA 26. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O $A_{STD0[L]}$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO **PCS** (50 mM DE PBS, 50 mM DE NaCl, 37 °C).

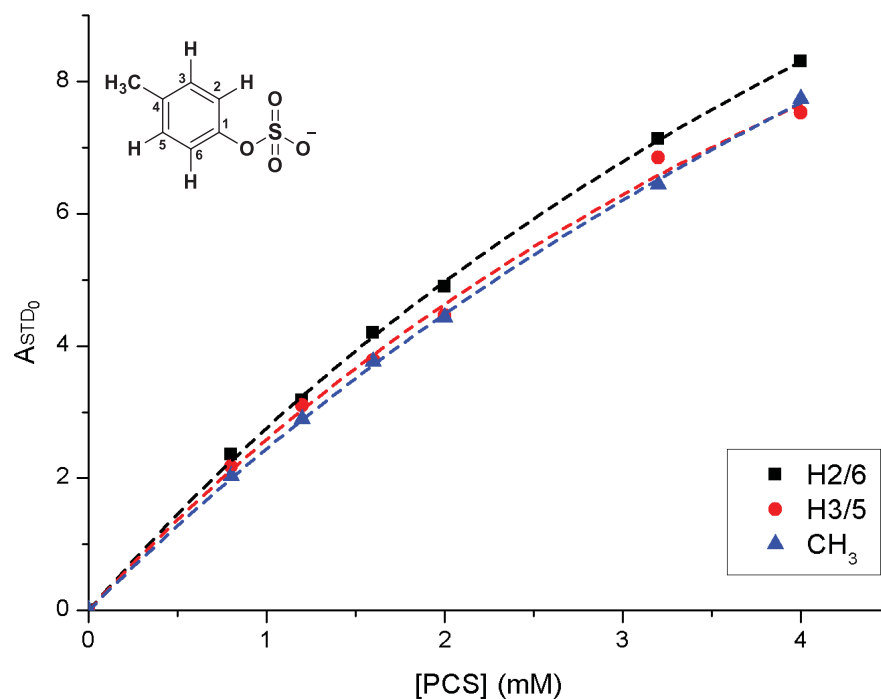
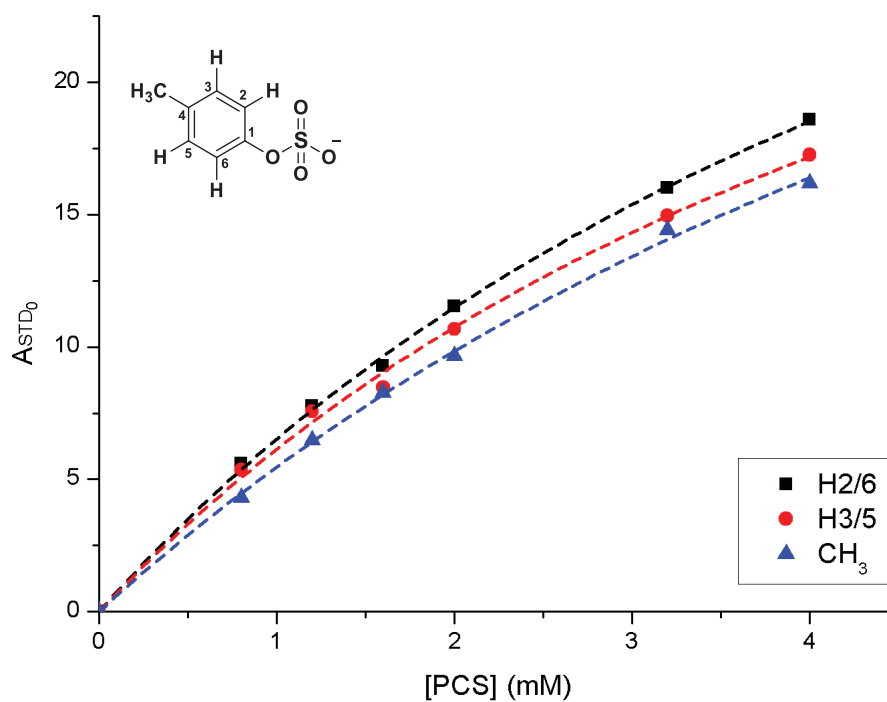


FIGURA 27. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O $A_{STD0[L]}$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO **PCS**. (50 mM DE PBS, 200 mM DE NaCl, 25 °C).



Entretanto, para o composto IS tanto o aumento da temperatura quanto o aumento da força iônica implicaram na diminuição da constante de dissociação (FIGURAS 28 e 29, TABELA 4), sugerindo que nessas condições ocorre uma maior afinidade dessa toxina com HSA. Esses resultados, assim como aquele observado nos experimentos de dicroísmo circular, sugerem que a HSA pode ainda conter resquício de acetiltryptofanato de sódio. O que sugere que nessas condições esse composto pode influenciar nas interações dessas toxinas com HSA através da competição pelo mesmo sítio de ligação.

FIGURA 28. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O $A_{STD0[L]}$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO **IS** (50 mM DE PBS, 50 mM DE NaCl, 37 °C).

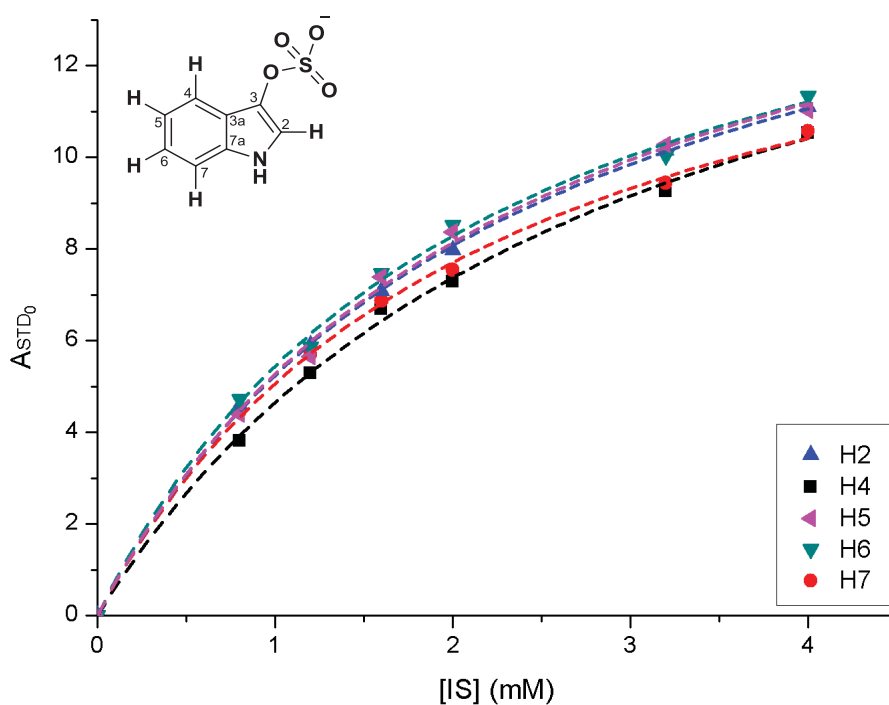


FIGURA 29. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O $A_{STD0[L]}$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO **IS** (50 mM DE PBS, 200 mM DE NaCl, 25 °C).

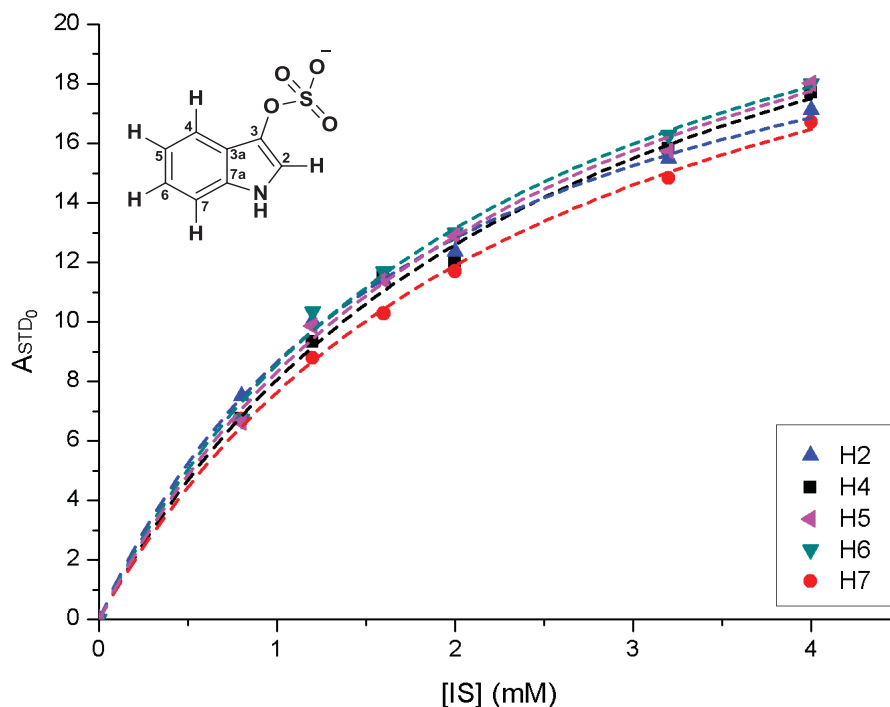


TABELA 4. CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO (K_d) CALCULADAS UTILIZANDO OS VALORES DE A_{STD0} PARA O **PCS** E **IS**

| SINAIS | PCS | | | IS | | |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | K_d (mM) ^A | K_d (mM) ^B | K_d (mM) ^C | K_d (mM) ^A | K_d (mM) ^B | K_d (mM) ^C |
| H-2 | 6,0 | 8,1 | 6,3 | 2,6 | 2,3 | 1,8 |
| H-3 | 5,4 | 7,5 | 6,0 | - | - | - |
| H-4 | - | - | - | 6,1 | 2,8 | 2,6 |
| H-5 | 5,4 | 7,5 | 6,0 | 7,1 | 2,4 | 2,4 |
| H-6 | 6,0 | 8,1 | 6,3 | 3,9 | 2,2 | 2,3 |
| H-7 | - | - | - | 4,2 | 2,2 | 2,5 |
| CH ₃ | 8,1 | 9,9 | 8,0 | - | - | - |
| MÉDIA | 6,5 | 8,5 | 6,8 | 4,8 | 2,4 | 2,3 |

Condições de análise: A: 50 mM PBS, 50 mM de NaCl, 25 °C; B: 50 mM PBS, 50 mM de NaCl, 37 °C e C: 50 mM PBS, 200 mM de NaCl, 25 °C.

4.5.3 Avaliação da influência de contaminantes nas constantes de dissociação (K_d) do PCS e IS ligados a HSA

Visando avaliar a influência dos possíveis contaminantes sobre as constantes de dissociação do PCS e IS com a HSA purificada, foram realizados experimentos utilizando uma HSA comercial com pureza de $\geq 99\%$ (FIGURAS 30 e 31).

Como pode-se observar na TABELA 5, houve uma diminuição dos valores das constantes de dissociação para o PCS ($K_d = 2,9$ mM) e IS ($K_d = 3,1$ mM), indicando que nesses sistemas há uma maior interação desses compostos com a HSA. Portanto, sugere-se que a presença de resquícios de acetiltryptofanato de sódio e caprilato de sódio na HSA purificada do medicamento Alburex provoque a diminuição dessas interações através da competição por sítios de ligação similares ou por mudanças causadas na conformação da proteína.

FIGURA 30. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O $A_{STD0[L]}$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO **PCS** (50 mM DE PBS, 50 mM DE NaCl, 25 °C).

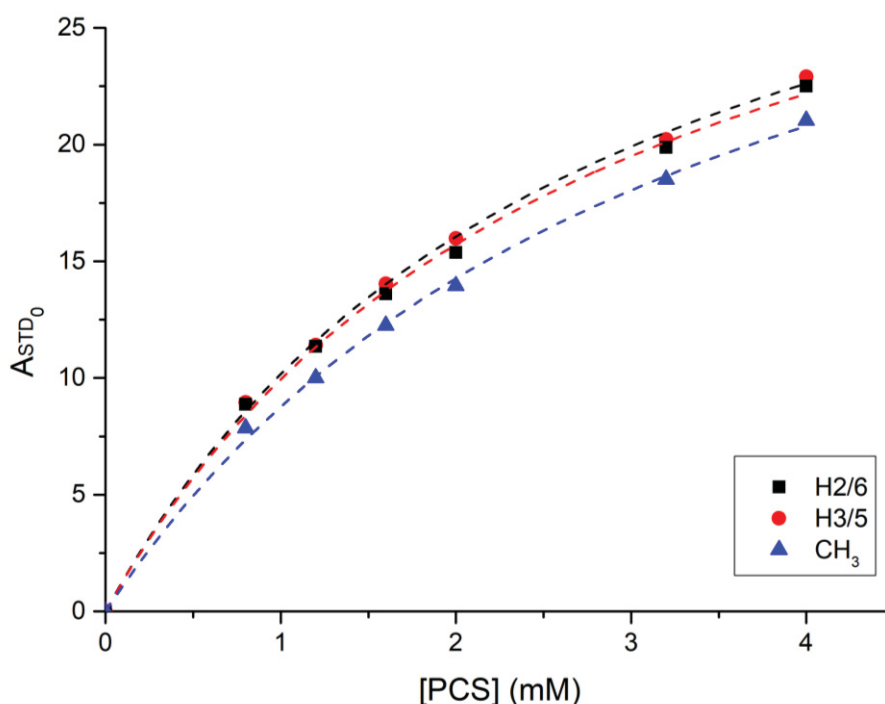


FIGURA 31. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O $A_{STD0[L]}$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO **IS** (50 mM DE PBS, 50 mM DE NaCl, 25 °C).

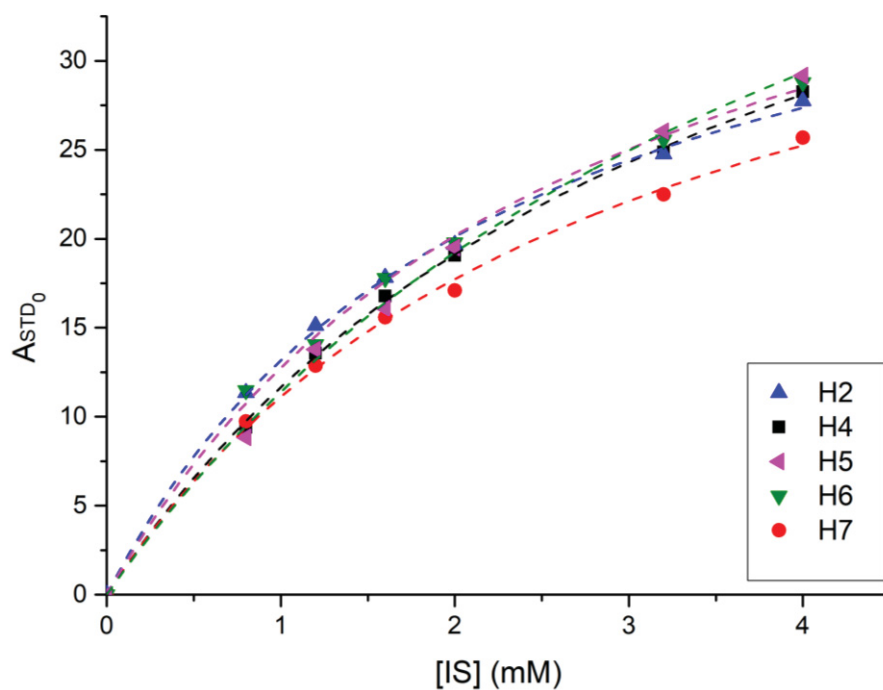


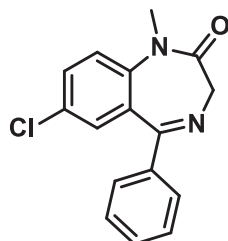
TABELA 5. CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO (K_d) CALCULADAS UTILIZANDO OS VALORES DE A_{STD0} PARA O **PCS** E **IS**

| SINAIS | PCS | | IS | |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | K_d (mM) ^A | K_d (mM) ^B | K_d (mM) ^A | K_d (mM) ^B |
| H-2 | 6,0 | 2,8 | 2,6 | 2,2 |
| H-3 | 5,4 | 2,8 | - | - |
| H-4 | - | - | 6,1 | 3,5 |
| H-5 | 5,4 | 2,8 | 7,1 | 4,4 |
| H-6 | 6,0 | 2,8 | 3,9 | 2,8 |
| H-7 | - | - | 4,2 | 2,9 |
| CH ₃ | 8,1 | 3,4 | - | - |
| MÉDIA | 6,5 | 2,9 | 4,8 | 3,1 |

Condições de análise: A: HSA purificada a partir do Alburex, 50 mM PBS, 50 mM de NaCl, 25 °C; B: HSA comprada da Sigma, 50 mM PBS, 50 mM de NaCl, 25 °C.

4.5.4 Caracterização do sítio de ligação do PCS

Para identificar o sítio de ligação do PCS na HSA purificada foi realizado o experimento de competição por RMN STD utilizando o diazepam como composto inibidor do sítio II da HSA (YAMASAKI et al., 2013).



O resultado desse experimento mostra que a constante de dissociação do PCS com HSA aumenta de 6,5 para 37,8 mM na presença do diazepam (FIGURA 32, TABELA 6). Portanto, a presença do diazepam no sistema implica na diminuição da interação do PCS com a HSA, sugerindo que ambos os compostos competem pelo mesmo sítio de ligação.

FIGURA 32. CURVA DE TITULAÇÃO UTILIZANDO O $A_{STD0[L]}$ EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTE [L] PARA O COMPOSTO **PCS** (2 mM DE DIAZEPAM; 50 mM DE PBS, 50 mM DE NaCl, 25 °C).

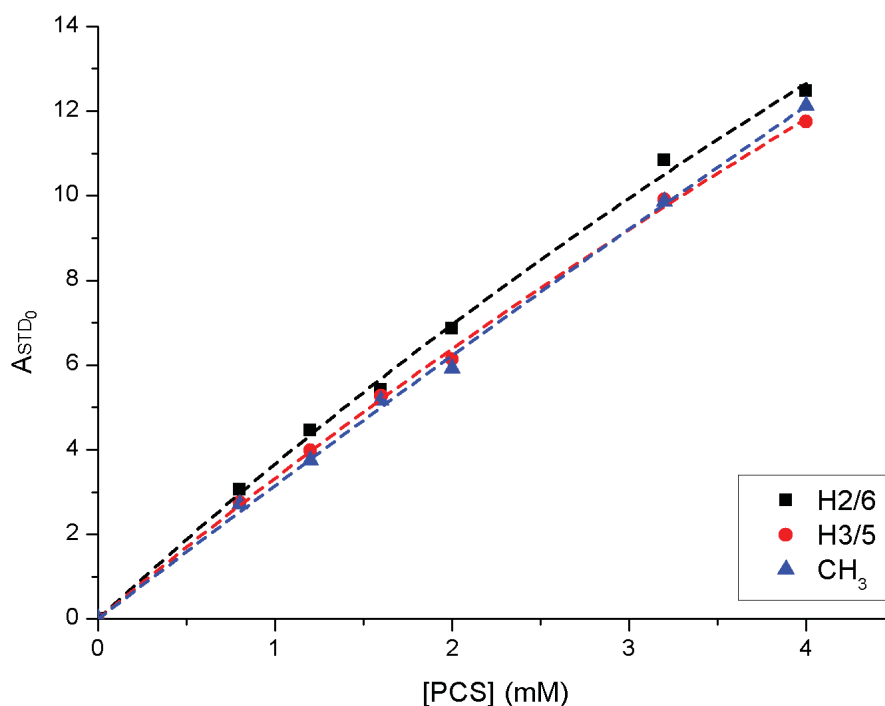


TABELA 6. CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO (K_d) CALCULADAS UTILIZANDO OS VALORES DE A_{STD0} DO PCS

| SINAIS | PCS | |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|
| | K_d (mM) ^A | K_d (mM) ^B |
| H-2/6 | 6,0 | 18,0 |
| H-3/5 | 5,4 | 22,7 |
| CH ₃ | 8,1 | 72,8 |
| MÉDIA | 6,5 | 37,8 |

Condições de análise: A: 50 mM PBS, 50 mM de NaCl, 25 °C e B: 2 mM de diazepam; 50 mM PBS, 50 mM de NaCl, 25 °C.

4.6 ESTUDOS DE TITULAÇÃO POR ITC

4.6.1 Determinação das constantes de associação das toxinas urêmicas PCS e IS ligadas a albumina humana

Os dados obtidos para o estudo das interações do PCS e IS com a HSA purificada foram tratados utilizando o programa do ITC associado ao Origin 7.0 que permite o ajuste dos dados experimentais a diferentes modelos matemáticos de acordo com a necessidade. Nesses modelos, pode-se ajustar a quantidade de sítios de ligação disponíveis para a interação. Além disso, essa quantidade de sítios é específica para cada ligante.

No caso da proteína HSA com as toxinas PCS e IS, sabe-se que essa interação ocorre principalmente em um único sítio de ligação (BERGÉ-LEFRANC et al., 2010; BERGÉ-LEFRANC et al., 2014), o que justificou o emprego do modelo de 1 sítio no ajuste dos dados. Além disso, pôde-se observar que as curvas obtidas nesse estudo apresentaram perfil similar a uma isoterma, diferentemente do esperado que seria um perfil sigmoide característico desse tipo de interação. Desse modo, a definição dos parâmetros termodinâmicos e cinéticos dessas interações torna-se menos exata e precisa (FIGURAS 33 e 34).

FIGURA 33. CURVAS DE ITC E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE **PCS** (10 mM) NA SOLUÇÃO DE HSA (0,1 mM), pH 7,2 À 37 °C. TODOS OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.

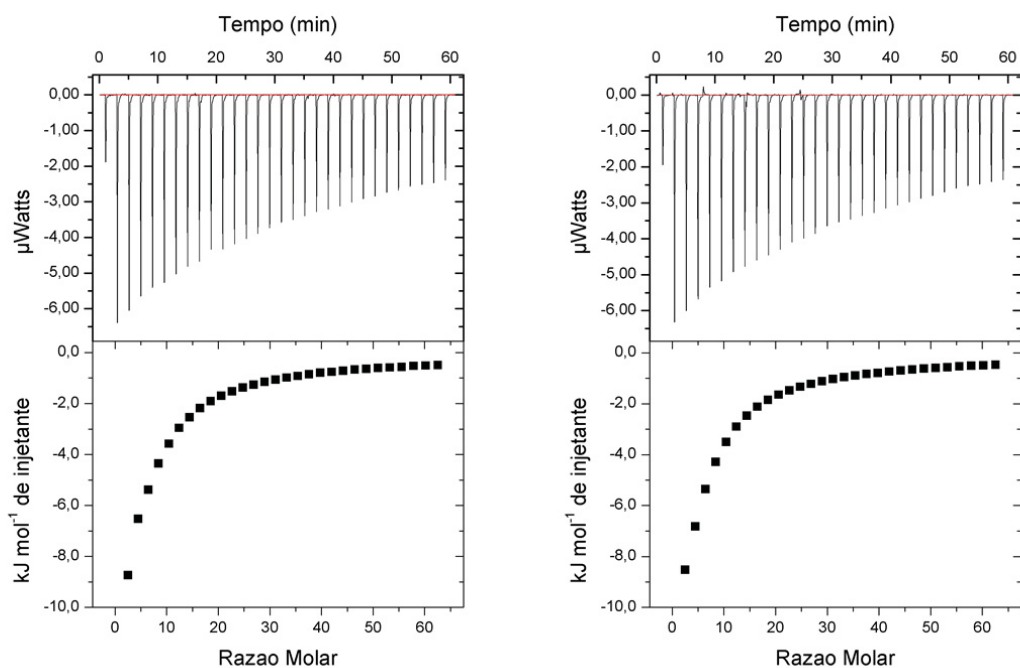
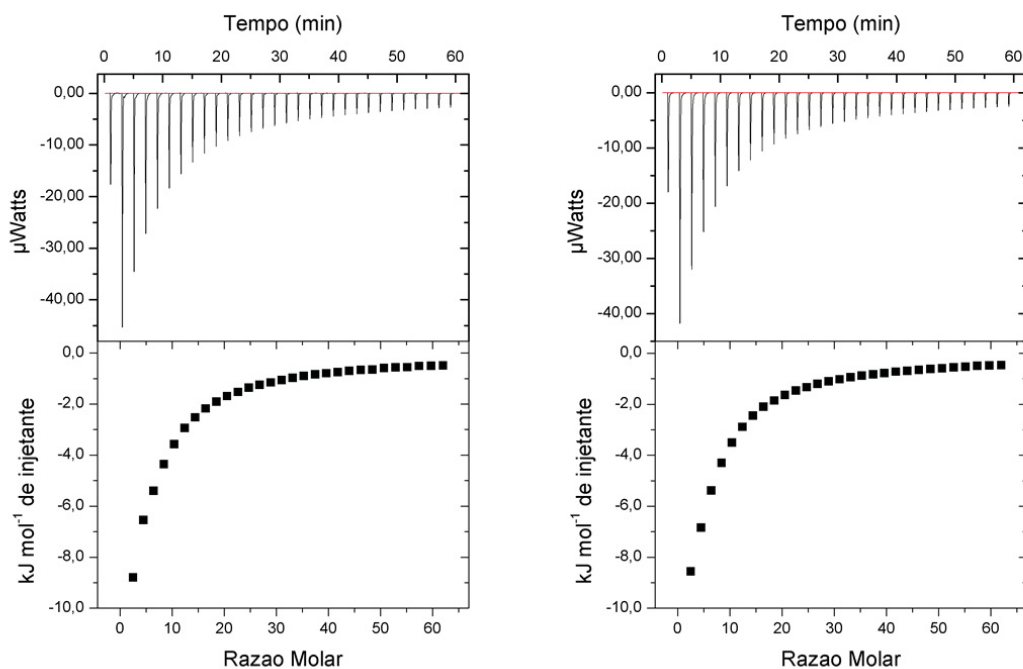


FIGURA 34. CURVAS DE ITC E ISOTERMAS DE LIGAÇÃO CORRESPONDENTES A TITULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE **IS** (30 mM) NA SOLUÇÃO DE HSA (0,1 mM), pH 7,2 À 37 °C. TODOS OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM DUPLICATA.



Contudo, uma forma de contornar essa problemática foi fixando o valor da estequiometria da interação no modelo empregado para o tratamento dos dados. Segundo Bergé-Lefranc e colaboradores (2010 e 2014), a estequiometria de interação do PCS e do IS com a HSA é de aproximadamente 1, dessa forma esse valor foi utilizado, e os valores de constante de ligação (K_a), entalpia de ligação (ΔH) e entropia (ΔS) para cada um dos compostos estudados foram calculados. Além disso, a energia livre de Gibbs (ΔG) foi obtida através da Equação 11:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{EQUAÇÃO 11}$$

Visando comparar os dados obtidos com os resultados dos experimentos de titulação por RMN STD foram calculados os valores das constantes de dissociação (K_d) a partir da Equação 12.

$$K_D = \frac{1}{K_A} \quad \text{EQUAÇÃO 12}$$

Os valores de K_a , K_d , ΔS , ΔH e ΔG obtidos para ambos os sistemas estão expressos na TABELA 7.

TABELA 7. PARÂMETROS TERMODINÂMICOS DO ESTUDO DE INTERAÇÃO ENTRE HSA E AS TOXINAS URÊMICAS **PCS** E **IS** OBTIDOS PELA TÉCNICA DE ITC.

| PARÂMETROS | AMOSTRAS | |
|--|------------------|------------------|
| | PCS ^A | IS ^B |
| n | 1 | 1 |
| K_a (M ⁻¹) | 779 ± 20,4 | 785 ± 20,9 |
| K_d (mM) | 1,3 ± 0,05 | 1,3 ± 0,05 |
| ΔH (Jmol ⁻¹) | -48280 ± 703,3 | -144750 ± 2139,5 |
| ΔS (Jmol ⁻¹ K ⁻¹) | -100,45 | -411,5 |
| ΔG (Jmol ⁻¹) | -44563,35 | -129524,5 |

Condições de análise: A: 0,1 mM de HSA, 10 mM de PCS, 50 mM de PBS, 50 mM de NaCl, pH 7,2, 37 °C; B: 0,1 mM de HSA, 30 mM de IS, 50 mM de PBS, 50 mM de NaCl, pH 7,2, 37 °C.

Do ponto de vista energético, a interação entre a proteína HSA e os compostos PCS e IS é exotérmica, ou seja, a interação molecular possui caráter

atrativo. Esse caráter exotérmico é verificado por meio da direção dos picos nas curvas de ITC (FIGURAS 33 e 34).

Através da análise dos dados obtidos, pode-se observar que a interação de ambos os compostos com a HSA é governada por altos valores de entalpia negativa o que sugere a presença de ligações de hidrogênio ou interações de Van der Waals entre essas moléculas e a proteína (O'BRIEN; HAQ, 2004). Além disso, essa observação indica que a interação entre o PCS e o IS com a HSA envolve forças eletrostáticas, conforme relatado anteriormente por Reynold e colaboradores (1967) em seu estudo sobre a interação de compostos sulfatados com a albumina sérica bovina.

Ademais, os dados termodinâmicos observados para ambas as toxinas permitiram sugerir que a ligação envolve interações eletrostáticas e hidrofóbicas (VELAZQUEZ-CAMPOY; TODD; FREIRE, 2000).

Esses resultados sugerem uma tendência similar aos resultados apresentados nos trabalhos de Bergé-Lefranc e colaboradores (2010 e 2014) que avaliaram a interação da HSA com o PCS e IS por ITC. Entretanto, novas análises são necessárias visando comprovar o comportamento observado, tendo em vista que as curvas de titulação isotérmicas obtidas não apresentaram um perfil sigmoidal o que pode comprometer a determinação dos parâmetros termodinâmicos.

5 CONCLUSÃO

O experimento de RMN STD mostrou-se uma ferramenta eficiente para a caracterização do mapeamento do epítipo das toxinas PCS e IS. Além disso, o experimento de RMN STD permitiu o estudo da interação dessas toxinas com a albumina sérica humana (HSA) através da determinação das constantes de dissociação (K_d) do complexo proteína-ligante, bem como possibilitou o estudo da influência dos fatores temperatura, força iônica e pureza da proteína nas interações entre os ligantes e a proteína.

Através desse experimento, foi observado que os hidrogênios H-3/5 e H-5 do PCS e IS, respectivamente, apresentaram maiores fatores de amplificação nos espectros de RMN STD. Esse dado sugere que esses hidrogênios apresentam maior proximidade com o sítio de ligação da proteína. A afinidade moderada de ambas as toxinas com a HSA purificada foi determinada pelas constantes de dissociação que assumiram valores de 6,5 mM e 4,8 mM a 25 °C para o PCS e IS, respectivamente, revelando a maior afinidade do IS pela proteína.

Com relação a avaliação da influência da temperatura e da força iônica nas constantes de dissociação do PCS e IS, observou-se o aumento da interação do IS com a proteína, apresentando as constantes de dissociação de $K_d = 2,4$ mM e $K_d = 2,3$ mM, respectivamente. Enquanto para o PCS o aumento da temperatura resultou na diminuição da interação com a HSA ($K_d = 8,5$ mM) e o aumento da força iônica não afetou essa interação ($K_d = 6,8$ mM). Esses resultados sugerem que a HSA purificada pode ainda conter resquício de acetiltryptofanato de sódio e caprilato de sódio.

Dessa forma, outros experimentos foram conduzidos a 25 °C utilizando a HSA ($\geq 99\%$ de pureza) e observou-se um aumento na afinidade de ambas as toxinas (PCS: $K_d = 2,9$ mM e IS: $K_d = 3,1$ mM) com a proteína, corroborando com a hipótese de que a presença dos resquícios de acetiltryptofanato de sódio e caprilato de sódio interferem nessas interações diminuindo a afinidade desses ligantes com HSA. Esse resultado é interessante pois evidencia a complexidade da compreensão desse tipo fenômeno, em que a presença de mais de um ligante que compete pelo mesmo sítio precisa ser levado em consideração.

A utilização do diazepam no ensaio de competição com o PCS e a HSA resultou na diminuição da interação do PCS com a HSA ($K_d = 37,8$ mM), sugerindo

que ambos os compostos competem pelo mesmo sítio de ligação na proteína. Entretanto, a adição do diazepam no sistema IS e HSA resultou na sobreposição dos sinais de ambos os ligantes no espectro de RMN, tornando a utilização deste inibidor inviável para o estudo deste sistema por RMN STD.

Com relação aos dados termodinâmicos obtidos pelo ITC, foi observado que a ligação do PCS e IS com a HSA envolve interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Além disso, observou-se que a interação desses compostos com a proteína é governada principalmente pela contribuição entálpica o que sugere a presença de ligações de hidrogênio ou interações de Van der Waals entre essas moléculas e a proteína.

Todos esses resultados fornecem uma contribuição para o entendimento das forças que regem as interações de PCS e IS com a HSA, que podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para aumentar a remoção desses compostos do organismo dos pacientes acometidos pela DRC.

5.1 PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos neste estudo, é possível elaborar algumas sugestões para a sua continuidade. São elas: otimizar as condições dos experimentos de ITC para ambas as toxinas (PCS e IS) visando a obtenção das curvas sigmóides para que os parâmetros termodinâmicos e cinéticos dessas interações sejam determinados com maior acurácia. Além disso, avaliar a influência de mudanças estruturais na HSA através da glicação dessa proteína, buscando entender o papel dessas alterações estruturais na retenção dessas toxinas em pacientes com DRC, uma vez que é comum a presença de outras enfermidades associadas a essa doença, como por exemplo a diabetes.

6 REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, C.; CALA, O.; KRIMM, I. Overview of probing protein-ligand interactions using NMR. **Current Protocols in Protein Science**, v. 81, p. 17.18.1-17.18.24, 2015.
- ANGLISTER, J.; SRIVASTAVA, G.; NAIDER, F. Detection of intermolecular NOE interactions in large protein complexes. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 97, p. 40-56, 2016.
- ANGULO, J.; DIAZ, I.; REINA, J.J.; TABARANI, G.; FIESCHI, F.; ROJO, J.; NIETO, P. M. Saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy characterization of dual binding mode of a mannose disaccharide to DC-SIGN. **Chembiochem**, v. 9, p. 2225–2227, 2008.
- ANGULO, J.; ENRÍQUEZ-NAVAS, P. M.; NIETO, P. M. Ligand-receptor binding affinities from saturation transfer difference (STD) NMR. **Chemistry - A European Journal**, v. 16, p. 7803–7812, 2010.
- BARRETO, F.C.; BARRETO, D.V.; LIABEUF, S.; MEERT, N.; GLORIEUX, G.; TEMMAR, M.; CHOUKROUN, G.; VANHOLDER, R.; MASSY, Z.A.; EUROPEAN UREMIC TOXIN WORK GROUP (EUTOX). Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 4, p. 1551–1558, 2009.
- BARRETO, F.C.; STINGHEN, A.E.; DE OLIVEIRA, R.B.; FRANCO, A.T.; MORENO, A.N.; BARRETO, D.V.; PECOITS-FILHO, R.; DRÜEKE, T.B.; MASSY, Z.A. The quest for a better understanding of chronic kidney disease complications: an update on uremic toxins. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, p. 221-235, 2014.
- BELLO, A.K.; ALRUKHAIMI, M.; ASHUNTANTANG, G.E.; BASNET, S.; ROTTER, R.C.; DOUTHAT, W.G.; KAZANCIOGLU, R.; KÖTTGEN, A.; NANGAKU, M.; POWE, N.R.; WHITE, S.L.; WHEELER, D.C.; MOE, O. Complications of chronic kidney disease: current state, knowledge gaps, and strategy for action. **Kidney International Supplements**, v. 7, p. 122-129, 2017.
- BERGÉ-LEFRANC, D.; CHASPOUL, F.; CALAF, R.; CHARPIOT, P.; BRUNET, P.; GALLICE, P. Binding of p-cresylsulfate and p-cresol to human serum

- albumin studied by microcalorimetry." **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, p. 1661-1665, 2010.
- BERGÉ-LEFRANC, D.; CHASPOUL, F.; CÉRINI, C.; BRUNET, P.; GALLICE, P. Thermodynamic study of indoxylsulfate interaction with human serum albumin and competitive binding with p-cresylsulfate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, p. 2021-2026, 2014.
- BLOCH, F. Nuclear Induction. **Physical Review**, v. 70, p. 460-474, 1946.
- BOUCHEMAL, K.; MAZZAFERRO, S. How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin-guest interactions. **Drug Discovery Today**, 2012
- BRANDÃO, E.; SANTOS SILVA, M.; GARCÍA-ESTÉVEZ, I.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V.; SOARES, S. Molecular study of mucin-procyanidin interaction by fluorescence quenching and Saturation Transfer Difference (STD)-NMR. **Food Chemistry**, v. 228, p. 427-434, 2017.
- CALA, O.; GUILLIÈRE, F.; KRIMM, I. NMR-based analysis of protein–ligand interactions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 943-956, 2014.
- CALLIES, O.; HERNÁNDEZ DARANAS, A. Application of isothermal titration calorimetry as a tool to study natural product interactions. **Natural Product Reports**, v. 33, p. 881-904, 2016.
- CARLOMAGNO, T. Ligand-target interactions: What can we learn from NMR? **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 34, p. 245-266, 2005.
- CLARIDGE, T.D.W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. Elsevier. Amsterdam, 2009.
- COHEN, G.; HORL, W. H. Immune dysfunction in uremia: an update. **Toxins**, v. 4, p. 962–990, 2012.
- COHEN, G.; GLORIEUX, G.; THORNALLEY, P.; SCHEPERS, E.; MEERT, N.; JANKOWSKI, J.; ARGILES, A.; ANDERSTAM, B.; BRUNET, P.; CERINI, C.; DOU, L.; DEPPISCH, R.; MARESCAU, B.; MASSY, Z.; PERNA, A.; RAUPACHOVA, J.; RODRIGUEZ, M.; STEGMAYR, B.; VANHOLDER, R.; HÖRL, W.H.; EUROPEAN UREMIC TOXIN WORK GROUP (EUTOX). Review on uraemic toxins III: recommendations for handling uraemic retention solutes in vitro – towards a standardized approach for research

- on uraemia. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 22, p. 3381–3390, 2007.
- CORRÊA, D.H.A.; RAMOS, C.H.I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, p.164-173, 2009.
- CRUZ, C.; SANTOS, S.D.; CABRITA, E.J.; QUEIROZ, J.A. Binding analysis between L-histidine immobilized and oligonucleotides by SPR and NMR. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 56, p. 175-180, 2013.
- CURRY, S.; MANDELKOW, H.; BRICK, P.; FRANKS, N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. **Nature Structural Biology**, v. 5, p. 827-835, 1998.
- DE VICENTE, M.E.S. The concept of ionic strength eighty years after its introduction in chemistry. **Journal of Chemical Education**, v. 81, p. 750-753, 2004.
- DEVINE, E.; KRIETER, D.H.; RÜTH, M.; JANKOVSKI, J.; LEMKE, H.D. Binding Affinity and Capacity for the Uremic Toxin Indoxyl Sulfate. **Toxins**, p. 416–429, 2014.
- FALCONER, R.J. Applications of isothermal titration calorimetry - the research and technical developments from 2011 to 2015. **Journal of Molecular Recognition**, v. 29, p. 504-515, 2016.
- FALCONER, R.J.; COLLINS, B.M. Survey of the year 2009: applications of isothermal titration calorimetry. **Journal of Molecular Recognition**, v. 25, p. 1-16, 2011.
- FANALI, G.; DI MAIS, A.; TREZZA, V.; MARINO, M.; FASANO, M.; ASCENZI, P. Human serum albumin: from bench to bedside. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, p. 209-290, 2012.
- FASANO, M.; CURRY, S.; TERRENO, E.; GALLIANO, M.; FANALI, G.; NARCISO, P.; NOTARI, S.; ASCENZI, P. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. **Life**, v. 57, p. 787-796, 2005.
- FECHNER, P.; BLEHER, O.; EWALD, M.; FREUDENBERGER, K.; FURIN, D.; HILBIG, U.; KOLAROV, F.; KRIEG, K.; LEIDNER, L.; MARKOVIC, G.; PROLL, G.; PRÖLL, F.; RAU, S.; RIEDT, J.; SCHWARZ, B.; WEBER, P.; WIDMAIER, J. Size does matter! Label-free detection of small molecule–

- protein interaction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 4033-4051, 2014.
- FEE, C.J. Label-free, real-time interaction and adsorption analysis 1: surface plasmon resonance. **Methods in Molecular Biology**, v. 906, p. 287-312, 2013b.
- FEE, C.J. Label-free, real-time interaction and adsorption analysis 2: quartz crystal microbalance. **Methods in Molecular Biology**, v. 906, p. 313-322, 2013a.
- FEIGENBAUM, J.; NEUBERG, C.A. Simplified method for the preparation of aromatic sulfuric acid esters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 63, p. 3529-3530, 1941.
- FENNEMA, O.R.; PARKIN, K.L.; DAMONDARAM, S. Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas. **Química de Alimentos de Fennema**. 4th ed., p.900, 2010. Porto Alegre: Artmed.
- FERNANDES, A.; BRÁS, N.F.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V. Understanding the molecular mechanism of anthocyanin binding to pectin. **Langmuir**, v. 30, p. 8516-8527, 2014.
- FIELDING, L. NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 51, p. 219-242, 2007.
- FIELDING, L.; RUTHERFORD, S.; FLETCHER, D. Determination of protein–ligand binding affinity by NMR: observations from serum albumin model systems. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 463-470, 2005.
- FIGUEIREDO, I.M.; MARSAIOLI, A.J. Mapeamento das interações proteína-ligante através de técnicas de RMN de ^1H utilizando detecção do ligante. **Química Nova**, v. 30, p. 1597-1605, 2007.
- FRASCA, V. Using Isothermal Titration Calorimetry Techniques to Quantify Enzyme Kinetics. **Industrial Biotechnology**, v. 12, p. 207-211, 2016.
- FURUKAWA, A.; KONUMA, T.; YANAKA, S.; SUGASE, K. Quantitative analysis of protein–ligand interactions by NMR. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 96, p. 47-57, 2016.
- GLASSOCK, R.J. Uremic toxins: what are they? An integrated overview of pathobiology and classification. **Journal of Renal Nutrition**, v. 18, p. 2–6, 2008.

- GAO, J.; MA, R.; WANG, W.; WANG, N.; SASAKI, R.; SNYDERMAN, D.; WU, J.; RUAN, K. Automated NMR fragment based screening identified a novel interface blocker to the LARG/RhoA complex. **PLoS One**, v. 9, p. e88098, 2014.
- GAO, H.; LEI, L.; LIU, J.; KONG, Q.; CHEN, X.; HU, Z. The study on the interaction between human serum albumin and a new reagent with antitumour activity by spectrophotometric methods. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 167, p. 213–221, 2004.
- GARCÍA-ESTÉVEZ, I.; CRUZ, L.; OLIVEIRA, J.; MATEUS, N.; DE FREITAS, V.; SOARES, S. First evidences of interaction between pyranoanthocyanins and salivary proline-rich proteins. **Food Chemistry**, v. 228, p. 574-581, 2017.
- GROLIER, J.-P.E.; DEL RÍO, J.M. On the physical meaning of the isothermal titration calorimetry measurements in calorimeters with full cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 5296–5325, 2009.
- GROSS, P.; MASSY, Z.A.; HENAUT, L.; BOUDOT, C.; CAGNARD, J.; MARCH, C.; KAMEL, S.; DRUEKE, T.B.; SIX, I. Para-cresyl sulfate acutely impairs vascular reactivity and induces vascular remodeling. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, p. 2927–2935, 2015
- GRYP, T.; VANHOLDER, R.; VANEECHOUTTE, M.; GLORIEUX, G. p-Cresyl Sulfate. **Toxins**, v. 9, p. 1-24, 2017.
- GUZZETTI, I.; CIVERA, M.; VASILE, F.; AROSIO, D.; TRINGALI, C.; PIARULLI, U.; GENNARI, C.; PIGNATARO, L.; BELVISI, L.; POTENZA, D. Insights into the binding of cyclic RGD peptidomimetics to $\alpha_5\beta_1$ integrin by using live-cell NMR and computational studies. **ChemistryOpen**, v. 6, p. 128-136, 2017.
- HAN, H.; ZHU, J.; ZHU, Z.; NI, J.; DU, R.; DAI, Y.; CHEN, Y.; WU, Z.; LU, L.; ZHANG, R. p-Cresyl sulfate aggravates cardiac dysfunction associated with chronic kidney disease by enhancing apoptosis of cardiomyocytes. **Journal of the American Heart Association**, v. 4, p. e001852, 2015.
- HARDING, S.E.; ROWE, A.J. Insight into protein–protein interactions from analytical ultracentrifugation. **Biochemical Society Transactions**, v. 38, p. 901–907, 2010.

- HARNER, M.J.; FRANK, A.O.; FESIK, S.W. Fragment-based drug discovery using NMR spectroscopy. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 56, p. 65–75, 2013.
- HAUSER, A.B.; STINGHEN, A.E.; KATO, S.; BUCCHARLES, S.; AITA, C.; YUZAWA, Y.; PECOITS-FILHO, R. Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. **Peritoneal Dialysis International**, v. 28, p. S183–187, 2008
- ITO, S.; YOSHIDA, M. Protein-bound uremic toxins: new culprits of cardiovascular events in chronic kidney disease patients. **Toxins**, v. 6, p. 665–678, 2014.
- JHA, V.; GARCIA-GARCIA, G.; ISEKI, K.; LI, Z.; NAICKER, S.; PLATTNER, B.; SARAN, R.; WANG, A.Y.; YANG, C.W. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. **The Lancet**, v. 382, p. 260–272, 2013.
- JOHNSON, K.A.; GOODY, R.S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper. **Biochemistry**, v. 50, p. 8264–8269, 2011.
- KABIRI, M.; UNSWORTH, L.D. Application of isothermal titration calorimetry for characterizing thermodynamic parameters of biomolecular interactions: peptide self-assembly and protein adsorption case studies. **Biomacromolecules**, v. 15, p. 3463–3473, 2014.
- KARPLUS, M. Dynamical aspects of molecular recognition. **Journal of Molecular Recognition**, v. 23, p. 102–104, 2010.
- KARPLUS, M.; KURIYAN, J. Molecular dynamics and protein function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 6679–6685, 2005.
- KOIZUMI, M.; TATEBE, J.; WATANABE, I.; YAMAZAKI, J.; IKEDA, T.; MORITA, T. Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates Indoxyl Sulfate-Induced Cellular Senescence in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 21, p. 904–916, 2014.
- KO, S.K.; KIM, J.; NA D.C.; PARK, S.; PARK, S.H.; HYUN, J.Y.; BAEK, K.H.; KIM, N.D.; KIM, N.K.; PARK, Y.N.; SONG, K.; SHIN, I. A small molecule inhibitor of ATPase activity of HSP70 induces apoptosis and has antitumor activities. **Chemistry; Biology**, v. 22, p. 391–403, 2015.
- KOOL, J.; JONKER, N.; IRTH, H.; NIESSEN, W.M. Studying protein–protein affinity and immobilized ligand–protein affinity interactions using MS-based methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 1109–1125, 2011.

- KRAGH-HANSEN, U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. **Pharmacological Reviews**, v. 33, p. 17-53, 1981.
- KRAGH-HANSEN, U.; CHUANG, V.T.; OTAGIRI, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, p. 695-704, 2002.
- KRISHNA, N.R.; JAYALAKSHMI, V. Quantitative analysis of STD NMR spectra of reversibly forming ligand-receptor complexes. **Topics in Current Chemistry**, v. 273, p. 15–54, 2008.
- LANG, B.E.; COLE, K.D. Unfolding properties of recombinant human serum albumin products are due to bioprocessing steps. **Biotechnology Progress**, v. 31, p. 62-69, 2015.
- LEKAWANVIJIT, S. Cardiotoxicity of Uremic Toxins: A Driver of Cardiorenal Syndrome. **Toxins**, v. 10, p. E352, 2018.
- LEONG, S.C.; SIRICH, T.L. Indoxyl sulfate-review of toxicity and therapeutic strategies. **Toxins**, v. 30, p. 1- 13, 2016.
- LIAN, L-Y. NMR studies of weak protein-protein interactions. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 71, p. 59–72, 2013.
- LIU, W.C.; TOMINO, Y.; LU, K.C. Impacts of Indoxyl Sulfate and p-Cresol Sulfate on Chronic Kidney Disease and Mitigating Effects of AST-120. **Toxins**, v. 10, p. 367-389, 2018
- MAYER, M.; JAMES, T. L. NMR-Based Characterization of Phenothiazines as a RNA Binding Scaffold. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, p. 4453-4460, 2004.
- MAYER, M.; MEYER, B. Characterization of ligand binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. **Angewandte Chemie**, v. 38, p. 1784-1788, 1999.
- MAYER, M.; MEYER, B. Group epitope mapping by Saturation Transfer Difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, p. 6108-6117, 2001.
- MEYER, B.; PETERS, T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. **Angewandte Chemie**, v. 42, p. 864-890, 2003.

- MEIJERS, B.K.; EVENEPOEL P. The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, p. 759-761, 2011.
- MEIJERS, B.K.; VAN KERCKHOVEN, S.; VERBEKE, K.; DEHAEN, W.; VANRENTERGHEM, Y.; HOYLAERTS, M.F.; EVENEPOEL, P. The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage. **American Journal of Kidney Diseases**, 2009, 54, p. 891–901, 2009.
- MONACO, S.; TAILFORD, L.E.; JUGE, N.; ANGULO, J. Differential epitope mapping by STD NMR spectroscopy to reveal the nature of protein-ligand contacts. **Angewandte Chemie**, v. 56, p. 15289–15293, 2017.
- MOSELEY, H.N.; CURTO, E.V.; KRISHNA, N.R. Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of NOESY spectra of interacting systems; two- dimensional transferred NOESY. **Journal of Magnetic Resonance, Series B**, v. 108, p. 243-261, 1995.
- NEIRYNCK, N.; VANHOLDER, R.; SCHEPERS, E.; ELOOT, S.; PLETINCK, A.; GLORIEUX, G. An update on uremic toxins. **International Urology and Nephrology**, v. 45, p.139-150, 2013.
- NÚÑEZ, S.; VENHORST, J.; KRUSE, C. G. Target – drug interactions: first principles and their application to drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 17, p. 10–22, 2012.
- O'BRIEN, R.; HAQ, I. **Biocalorimetry 2**. Applications of biocalorimetry: binding, stability and enzyme kinetics. Edited by John E. Ladbury and Michael Doyle, John Wiley; Sons, p. 10-11, 2004.
- OVERHAUSER, A. W. Polarization of Nuclei in Metals. **Physical Review**, v. 92, p. 411-415, 1953.
- PELLECCHIA, M.; SEM, D.S; WÜTHRICH, K. NMR in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 211-219, 2002.
- PERRY, J.J.; TAINER, J.A. Developing advanced X-ray scattering methods combined with crystallography and computation. **Methods**, v. 59, p. 363-371, 2013.
- POVEDA, J.; SANCHEZ-NIÑO, M.D.; GLORIEUX, G.; SANZ, A.B.; EGIDO, J.; VANHOLDER, R.; ORTIZ, A. p-Cresyl sulphate has proinflammatory and

- cytotoxic actions on human proximal tubular epithelial cells. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 29, p. 56-64, 2014.
- PURCELL, E.M.; TORREY, H.C.; POUND, R.V. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. **Physical Review**, v. 69, p. 37-38, 1946.
- RAMALHETE, S.M.; NARTOWSKI, K.P.; SARATHCHANDRA, N.; FOSTER, J.S.; ROUND, A.N.; ANGULO, J.; LLOYD, G.O.; KHIMYAK, Y.Z. Supramolecular amino acid-based hydrogels: Probing the contribution of additive molecules using NMR spectroscopy. **Chemistry**, v. 23, p. 8014–8024, 2017.
- REYNOLDS, J.A.; HERBERT, S.; POLET, H.; STEINHARDT, J. The binding of divers detergent anions to bovine serum albumin. **Biochemistry**, v. 6, p. 937-947, 1967.
- RONCO, W.; CLARK, W.R. Haemodialysis membranes. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, p. 394–410, 2018.
- ROWE, A.J. Ultra-weak reversible protein-protein interactions. **Methods**, v. 54, p. 157-166, 2011.
- SAPONARO, A. Isothermal Titration Calorimetry: A biophysical method to characterize the interaction between label-free biomolecules in solution. **Bio-protocol**, v. 8, p. 1-11, 2018. Disponível em: <<http://www.bio-protocol.org/e2957>>. Acesso em: 03 março 2019.
- SASSAKI, G.L.; ELLI, S.; RUDD, T.R.; MACCHI, E.; YATES, E.A.; NAGGI, A.; SHRIVER, Z.; RAMAN, R.; SASISEKHARAN, R.; TORRI, G.; GUERRINI, M. Human ($\alpha 2 \rightarrow 6$) and Avian ($\alpha 2 \rightarrow 3$) sialylated receptors of influenza A virus show distinct conformations and dynamics in solution. **Biochemistry**, v. 52, p. 7217-7230, 2013.
- SCHEPERS, E.; MEERT, N.; GLORIEUX, G.; GOEMAN, J.; VAN DER EYCKEN, J.; VANHOLDER, R. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 22, p. 592–596, 2007.
- SLAUGHTER, B.D.; LI, R. Toward quantitative “*in vivo* biochemistry” with fluorescence fluctuation spectroscopy. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, p. 4306-4311, 2010.
- SURYAWANSHI, V.D.; WALEKAR, L.S.; GORE, A.H.; ANBHULE, P.V., KOLEKAR, G.B. Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically

- active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 56-63, 2016.
- TAKEUCHI, K.; WAGNER, G. NMR studies of protein interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 16, p. 109-117, 2006.
- VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; TODD, M.J.; FREIRE, E. HIV-1 protease inhibitors: enthalpic versus entropic optimization of the binding affinity. **Biochemistry**, v. 39, p. 2201–2207, 2000.
- VIEGAS, A.; MANSO, J.; CORVO, M.C.; MARQUES, M.M.B.; CABRITA, E.J. Binding of ibuprofen, ketorolac, and diclofenac to COX-1 and COX-2 studied by Saturation Transfer Difference NMR. **Journal of Chemical Education**, v. 88, p. 990-994, 2011a.
- VIEGAS, A.; MANSO, J.; NOBREGA, F.L.; CABRITA, E.J. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: a simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding. **Journal of Chemical Education**, v. 88, p. 990-994, 2011b.
- WALPOLE, S.; MONACO, S.; NEPRAVISHTA, R.; ANGULO, J. STD NMR as a Technique for Ligand Screening and Structural Studies. **Methods in Enzymology**, v. 615, p. 423-451, 2019.
- WATANABE, H.; NOGUCHI, T.; MIYAMOTO, Y.; KADOWAKI, D.; KOTANI, S.; NAKAJIMA, M.; MIYAMURA, S.; ISHIMA, Y.; OTAGIRI, M.; MARUYAMA, T. Interaction between two sulfate-conjugated uremic toxins, p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate, during binding with human serum albumin. **Drug Metabolism; Disposición**, v. 40, p.1423-1428, 2012.
- WHITED, A.M.; PARK, P.S. Atomic force microscopy: a multifaceted tool to study membrane proteins and their interactions with ligands. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1838, p. 56-68, 2014.
- YAMASAKI, K.; CHUANG, V.T.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M. Albumin–drug interaction and its clinical implication. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 5435–5443, 2013.
- YAN, J.; KLINE, A.D.; MO, H.; SHAPIRO, M.J. ZARTLER, E.R. The effect of relaxation on the epitope mapping by saturation transfer difference NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 163, p. 270-276, 2003.
- YANG, K.; NIE, L.; HUANG, Y.; ZHANG, J.; XIAO, T.; GUAN, X.; ZHAO, J. Amelioration of uremic toxin indoxyl sulfate-induced endothelial cell

dysfunction by Klotho protein. **Toxicology Letters**, v. 215, p. 77–83, 2012.

YANG, M.; FOX, C.H.; VASSALOTTI, J.; CHOI, M. Complications of Progression of CKD. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 18, p. 400–405, 2011.